

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Müller
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



Mechanismen der transkriptionellen Regulation durch c-Myc

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sandra Bernard
aus Kassel

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg am 14.02.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. M. Eilers

Korreferent: Prof. Dr. T. Stiewe

1	EINLEITUNG.....	8
1.1	TRANSKRIPTIONELLE REGULATION IN EUKARYOTISCHEN ZELLEN.....	8
1.1.1	<i>Chromatin und Transkription</i>	9
1.1.2	<i>Regulation der Polymeraseaktivität</i>	12
1.2	DER MEDIATORKOMPLEX.....	13
1.2.1	<i>Identifikation des Mediatorkomplexes als genereller Kofaktor</i>	13
1.2.2	<i>Strukturelle Konservierung des Mediatorkomplexes</i>	15
1.2.3	<i>Aktive und inaktive Form des Mediatorkomplexes</i>	18
1.2.4	<i>Funktionen des Mediatorkomplexes in der Transkription.....</i>	19
1.2.5	<i>Der Mediatorkomplex interagiert mit zahlreichen Transkriptionsfaktoren</i>	21
1.3	DER TRANSKRIPTIONSFAKTOR MYC	23
1.3.1	<i>Struktur und konservierte Domänen von Myc</i>	25
1.3.2	<i>Das Myc/Max/Mad-Netzwerk.....</i>	27
1.3.3	<i>Transkriptionelle Regulation durch Myc.....</i>	28
1.3.3.1	<i>Mechanismen der Myc-vermittelten Transaktivierung</i>	32
1.3.3.2	<i>Myc-vermittelte Transrepression.....</i>	37
1.4	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	41
2	MATERIAL	42
2.1	STÄMME UND ZELLINIEN.....	42
2.1.1	<i>Bakterienstämme</i>	42
2.1.2	<i>Säugerzellen</i>	42
2.2	MEDIEN.....	43
2.2.1	<i>Medien für die Bakterienkultur</i>	43
2.2.2	<i>Medien und Lösungen für die Zellkultur.....</i>	43
2.2.3	<i>Selektionsantibiotika</i>	45
2.3	SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTIDE	45
2.3.1	<i>Primer für die RT-PCR.....</i>	46
2.3.2	<i>Primer zur Amplifikation genomischer Loci.....</i>	47
2.3.3	<i>Primer für die Klonierung</i>	47
2.3.4	<i>Oligonukleotide zur Klonierung in pSUPER-Vektoren.....</i>	48
2.4	PLASMIDE	48
2.4.1	<i>Grundvektoren</i>	48
2.4.2	<i>Expressionsplasmide</i>	49
2.4.3	<i>Expressionsplasmide für prokaryotische Expression</i>	51
2.4.4	<i>Reporterplasmide.....</i>	51
2.5	LÖSUNGEN UND PUFFER.....	52
2.5.1	<i>Lösungen für die Zellkultur</i>	52
2.5.2	<i>Lösungen für Reporterassays.....</i>	53
2.5.3	<i>Lösungen für Immunfluoreszenz</i>	53

2.5.4	Lösungen für Proteinextraktion und -konzentrationsbestimmung	53
2.5.5	Lösungen für SDS-PAGE, Westernblot und Immunpräzipitation	54
2.5.6	Lösungen für die Silberfärbung.....	55
2.5.7	Lösungen für RNA-Extraktion	56
2.5.8	Lösungen für PCR, RT-PCR und qPCR.....	56
2.5.9	Lösungen für DNA-Extraktion und Agarose-Gelelektrophorese.....	56
2.5.10	Lösungen für Chromatinimmunpräzipitation	57
2.5.11	Lösungen für Kernextraktion.....	59
2.5.12	Lösungen für IVT-GST-Pulldown.....	59
2.5.13	Lösungen für Oligonukleotid-Pulldown	60
2.5.14	Lösungen für Ni-NTA-Aufreinigung von His-Tag Proteinen.....	61
2.5.15	Lösungen für die Aufreinigung von GST- Proteinen.....	61
2.6	CHEMIKALIEN	62
2.7	STANDARDS UND ENZYME.....	62
2.7.1	Standards.....	62
2.7.2	DNA modifizierende Enzyme	63
2.8	FILME, FILTER UND MEMBRANE	63
2.9	GERÄTE	64
2.10	ANTIKÖRPER	65
2.10.1	Primäre Antikörper	65
2.10.2	Sekundäre Antikörper	66
2.11	KIT-SYSTEME	67
3	METHODEN	69
3.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	69
3.1.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden	69
3.1.2	Kultivierung und Lagerung von Bakterien.....	69
3.1.3	Transformation chemokompetenter Bakterien	69
3.1.4	Plasmidamplifikation und Isolation aus Bakterien	70
3.1.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	70
3.1.6	Aufreinigung von DNA	71
3.1.6.1	Aufreinigung von DNA aus Lösungen	71
3.1.6.2	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	71
3.1.7	Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA (Restriktionsverdau)	71
3.1.8	Ligation	72
3.1.9	Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion.....	72
3.1.9.1	Quantitative PCR (qPCR, Realtime PCR)	72
3.1.9.2	Nicht-quantitative PCR	73
3.1.10	cDNA Synthese.....	74
3.1.11	Photometrische Messung von DNA-und RNA-Konzentrationen	74
3.1.12	Isolation von Gesamt-RNA aus Säugerzellkulturen	75

3.1.13	Microarray	76
3.2	PROTEINBIOCHEMISCHE UND IMMUNBIOLOGISCHE METHODEN	76
3.2.1	Proteinbestimmung nach Bradford	76
3.2.2	Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	77
3.2.3	Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	77
3.2.4	Silber-Färbung von Polyacrylamidgelen	77
3.2.5	Westernblot	77
3.2.6	Koimmunpräzipitation	78
3.2.7	Chromatinimmunpräzipitation	79
3.2.8	Immunfluoreszenz	82
3.2.9	Expression rekombinanter Proteine in Bakterien	82
3.2.10	Affinitätschromatografische Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	83
3.2.11	Isolation von Zellkernproteinen (Kernextraktion)	84
3.2.12	GST-Pulldown aus Kernextrakt	84
3.2.13	Oligonukleotid-Pulldown von DNA-bindenden Proteinen	85
3.2.14	in vitro Translation	86
3.2.15	GST-Pulldown in vitro translatierter Proteine	86
3.3	ZELLBIOLOGISCHEN METHODEN	87
3.3.1	Allgemeine Kulturbedingungen	87
3.3.2	Passagieren von Zellkulturen	87
3.3.3	Bestimmung der Zellzahl	87
3.3.4	Einfrieren und Auftauen von Säugerzellkulturen	88
3.3.5	Regulation der MYC-Expression in P493-6 Zellen (Myc TET-OFF)	88
3.3.6	Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellkulturen	89
3.3.6.1	Transiente Transfektion mit der Calcium-Phosphat-Methode	89
3.3.6.2	Stabile Transfektion von Säugerzellen	90
3.3.7	Retrovirale Infektionen zur Integration von Plasmid-DNA	90
3.3.7.1	Herstellung rekombinanter Retroviren	90
3.3.7.2	Infektionen von Zellen mit rekombinanten Retroviren	91
3.3.8	Bestimmung der Luziferaseaktivität	91
3.3.9	Bestimmung der β -Galactosidasaktivität	92
4	ERGEBNISSE	93
4.1	KOFAKTOREN UND TRANSKRIPTIONSMECHANISMEN VON C-MYC	93
4.1.1	Tetrazyklin-abhängige Regulation der Myc-Expression in P493-6-Zellen	93
4.1.2	Regulation von MYC-Zielgenen in P493-6-Zellen	94
4.1.3	Genomische Myc-Bindestellen werden unterschiedlich stark von Myc besetzt	96
4.1.4	MB2-abhängige Kofaktoren werden zu aktivierten und reprimierten Zielgenen rekrutiert	97
4.1.5	Myc-abhängige Rekrutierung von Tip48/Tip49 in vitro	99

4.1.6	<i>Myc-abhängige Histon-Acetylierung findet auch an Myc-reprimierten Zielgenen statt</i>	101
4.1.7	<i>Myc induziert die Serin5-Phosphorylierung der RNAPII</i>	102
4.1.8	<i>Der Myc-Kofaktor p300 wird differenziell von Myc rekrutiert</i>	104
4.2	INTERAKTION ZWISCHEN MYC UND DEM MEDIATORKOMPLEX	105
4.2.1	<i>Die aktive Form des Mediator-Komplexes lässt sich in vitro aus Kernextrakten mit GST-Myc besser aufreinigen als die Cdk8-haltige, inaktive Form</i>	106
4.2.1.1	<i>Klonierung und prokaryotische Expression von GST-Myc-Allelen</i>	106
4.2.1.2	<i>Aufreinigung des endogenen Mediatorkomplexes aus Kernextrakten</i>	108
4.2.2	<i>In vitro Interaktion einzelner Mediator-Untereinheiten mit GST-Myc</i>	109
4.2.3	<i>In vivo Interaktion einzelner Mediator-Untereinheiten mit Myc</i>	112
4.2.4	<i>Die in vivo Interaktion zwischen Myc und Med24 lässt sich nicht auf eine einzelne Region innerhalb des Myc Proteins eingrenzen</i>	113
4.2.5	<i>Die Myc-abhängige Transaktivierung in vivo lässt sich durch die Überexpression von Med24 nicht verstärken</i>	118
4.2.6	<i>In vivo Rekrutierung des Mediatorkomplexes zu Myc-Zielgenen</i>	120
4.2.7	<i>Cdk8 wird nicht zum Myc-reprimierten Zielgen c/EBPα rekrutiert</i>	122
4.2.8	<i>Short-hairpin-vermittelter Gen-knockdown führt zu einer deutlichen Reduktion an Med24 RNA in HeLa-Zellen</i>	123
4.2.9	<i>knockdown von Med24 führt zur Herunterregulation zahlreicher Myc-Zielgene</i>	124
5	DISKUSSION	129
5.1	MYC-ABHÄNGIGE TRANSKRIPTIONSMECHANISMEN	129
5.1.1	<i>Das Zellsystem P493-6 ermöglicht die Validierung von direkten Myc-Zielgenen</i>	129
5.1.2	<i>Myc verfügt über verschiedene Mechanismen zur transkriptionellen Regulation</i>	131
5.1.3	<i>Myc rekrutiert die MB2-abhängige Kofaktoren sowohl zu dem aktivierten als auch reprimierten Zielgen</i>	132
5.1.4	<i>Myc induziert CTD-Phosphorylierung an Rbp1, der großen Untereinheit des RNAPII-Komplexes</i>	134
5.1.5	<i>p300 wird differentiell zu dem aktivierten Zielgen rekrutiert</i>	135
5.2	INTERAKTION ZWISCHEN MYC UND DEM MEDIATORKOMPLEX	135
5.2.1	<i>Zahlreiche Untereinheiten eines Moduls des Mediatorkomplexes interagieren in vitro mit c-Myc</i>	137
5.2.2	<i>Myc interagiert in vivo mit der Mediator-Untereinheit Med24</i>	138
5.2.3	<i>Die Untereinheit des Mediatorkomplexes Med24</i>	139
5.2.4	<i>In transienten Transkriptionsassays übt Med24 keinen deutlichen Effekt auf die Myc-vermittelte Transaktivierung aus</i>	141
5.2.5	<i>Die Reduktion von Med24 bedingt die Deregulation zahlreicher Myc-Zielgene</i>	141
6	ZUSAMMENFASSUNG	143
6.1	ABSTRACT	143

7	LITERATURVERZEICHNIS.....	145
8	ANHANG.....	165
8.1	ABKÜRZUNGEN.....	165
8.2	AKADEMISCHE LEHRER.....	171
8.3	DANKSAGUNG	171
8.4	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	1712

1 Einleitung

1.1 Transkriptionelle Regulation in eukaryotischen Zellen

Die Expression protein-kodierender Gene ist ein komplexer Prozess, der mit der Initiation der Transkription an den Promotoren der betreffenden Gene beginnt. Die eukaryotischen RNA-Polymerasen erkennen den Transkriptionsstartpunkt von Genen nur in Verbindung mit generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs), und der RNA Polymerase II-Komplex (RNAPII) und seine assoziierten generelle Transkriptionsfaktoren (TFII-A, TFII-B, TFII-D, TFII-E, TFII-F und TFII-H) stellen den minimalen (basalen) Apparat für die Transkription der proteinkodierenden Gene dar. Bindet dieser basale Apparat *in vitro* eine Promotorregion in unmittelbarer Nähe der transkriptionellen Startstelle (den *core*-Promotor), ermöglicht dies eine basale (d. h. Aktivator-unabhängige) Transkription des betreffenden Gens (Übersichtsartikel: Roeder, 1996; Thomas and Chiang, 2006). Eine Regulierbarkeit der RNAPII durch Aktivatoren in diesem *in vitro* System ist von der Anwesenheit eines weiteren Multiproteinkomplexes, dem Mediator, abhängig.

In vivo ist die basale Aktivität der RNAPII normalerweise durch die kompakte Organisation des Chromatins unterdrückt. Hier wird die Transkription erst durch regulatorische Transkriptionsfaktoren und deren Kofaktoren ermöglicht (Roeder, 2005; Sims et al., 2004). Die regulatorischen Transkriptionsfaktoren binden sequenz-spezifisch an DNA-Elemente, welche sich entweder innerhalb der Promotoren ihrer Zielgene oder auch weit entfernt davon in Enhancerelementen befinden können. Sie sind modular aufgebaut, verfügen in der Regel über eine DNA-Bindedomäne sowie eine Transaktivierungs- bzw. Transrepressionsdomäne und werden nach strukturellen Motiven klassifiziert. Der größte Teil der sequenz-spezifischen Transkriptionsfaktoren beeinflusst die Initiation der Transkription, indem sie die Assemblierung des Präinitiationskomplexes am Promotor beeinflusst. Hierzu interagieren sie entweder direkt mit dem basalen Transkriptionsapparat oder beeinflussen mit Hilfe von Kofaktoren die Chromatinstruktur in der Umgebung ihrer Zielgene (Fischle et al., 2003; Warren, 2002). Die Kofaktoren binden nicht direkt an die

DNA, sondern werden durch Transkriptionsfaktoren rekrutiert. Kofaktoren verfügen oftmals über Enzymaktivitäten, mit der sie Histone, aber auch DNA, den basalen Transkriptionsapparat oder andere Transkriptionsfaktoren modifizieren können.

Für die Integration verschiedener Signale von regulatorischen Transkriptionsfaktoren sind große Multiproteinkomplexe, sog. generelle Kofaktoren wie TFII-D und der Mediator-Komplex an den Promotoren der Gene notwendig (Fondell et al., 1999; Marr et al., 2006; Naar et al., 1998). Obwohl die Funktionen von TFII-D und dem Mediator häufig als redundant bezeichnet wurden, benötigen viele Promotoren beide dieser Komplexe für die Integration der regulatorischen Signale (Marr et al., 2006).

1.1.1 Chromatin und Transkription

Das Genom eukaryotischer Zellen ist innerhalb des Zellkerns auf Chromosomen verteilt, die als Nukleoprotein-Komplexe (Chromatin) vorliegen. Das Grundgerüst des Chromatins bilden oktamere Proteinkomplexe aus den *core*-Histonen H2A, H2B, H3 und H4, um die sich die DNA windet (Nukleosomen). Die Nukleosomen sind zu übergeordneten, dicht gepackten Strukturen zusammengelagert, wobei Histon H1 sowie die N-terminalen Enden der Histonproteine eine Rolle spielen. Die N-Termini der Histonproteine ragen aus dem Proteinkomplex heraus und interagieren mit regulatorischen Faktoren sowie mit anderen Nukleosomen.

Genreiche, transkriptionell aktive Abschnitte des Chromatins (Euchromatin) zeichnet sich gegenüber dem transkriptionell inaktiven Heterochromatin durch eine geringere Packungsdichte sowie durch spezifische Histonmodifikationen und -varianten aus und befindet sich in räumlich separaten Kompartimenten des Zellkerns (Übersichtsartikel: Misteli, 2001).

Neben der räumlichen Organisation der Zellkernkompartimente ist eine dynamische und lokale Regulation einzelner Gen-Aktivitäten von entscheidender Bedeutung für die Homöostase der Zelle. Hierbei spielen die

N-terminalen Domänen der Histone, welche aus dem Nukleosom herausragen, eine besondere Rolle. Sie unterliegen diversen posttranslationalen Modifikationen. Man findet unter den Histonmodifikationen Lysin-Acetylierung, Lysin-und Arginin-Methylierung, Serin-und Threonin-Phosphorylierung sowie Lysin-Ubiquitinylierung. Bestehende Modifikationen können hierbei weitere Modifikationen beeinflussen, und die biologischen Effekte können von komplexen Modifikationsmustern abhängen (Strahl and Allis, 2000; Wu and Grunstein, 2000).

Histonmodifikationen werden von verschiedenen Domänen in regulatorischen Proteinen gebunden. Hierzu zählt z.B. die Bromodomäne (z.B. in TAFII250), welche Lysin-acetylierte Histone erkennt oder die Chromodomäne des HP1-Protein, welche Lysin-methylierte Histone (H3-Met.-Lys9) erkennt (Dhalluin et al., 1999; Owen et al., 2000; Winston and Allis, 1999).

Histon-Acetylierung findet man präferentiell im Bereich aktiver Gene, und die Hyperacetylierung von Histon H3 sowie Histon H4 stellen einen grundlegenden Mechanismus zur lokalen Regulation der Transkription dar (Uitley et al., 1998). Die Aktivität von Histon-Acetyltransferasen (HATs) verringert die Assoziation zwischen den Histonen und der DNA, die Nukleosomen und das Chromatin sind in Folge dessen weniger dicht gepackt und zugänglicher für Transkriptionsfaktoren bzw. den basalen Transkriptionsapparat. Es wurden zahlreiche Kernproteine mit HAT-Aktivität identifiziert, die man aufgrund von Sequenzhomologien in drei HAT Familien einteilt: Die GNAT (SAGA/PCAF/Gcn5), die MYST (NuA4/TIP60) und die p300/CBP Familie (Sternier and Berger, 2000). HATs acetylieren neben Histonen auch Nicht-Histonproteine (Brown et al., 2000; Narlikar et al., 2002).

Histon-Deacetylasen (HDACs) entfernen Acetylgruppen von den Lysinen der Histone, und deacetylierte Nukleosomen korrelieren häufig mit transkriptioneller Repression (Kadosh and Struhl, 1998). Die Deacetylierung der Histone führt zu einer Verdichtung des Chromatins und erschwert möglicherweise den Zugang des Transkriptionsapparates an den Promotor.

HDACs sind in drei Klassen zusammengefasst. Klasse I HDACs (HDACs 1, 2, 3, und 8) ähneln dem Hefe-Protein RPD3 und sind im Kern lokalisiert. Klasse II HDACs (HDACs 4, 5, 6, 7, 9, und 10) sind zu dem Hefeprotein HDA1 homolog und können sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus enthalten sein. Die dritte Klasse der HDACs bildet eine strukturell unterschiedliche Klasse von NAD-abhängigen Enzymen, die Ähnlichkeit mit den SIR2 (silent information regulator 2)-Proteinen in Hefe aufweisen (Gray and Ekstrom, 2001).

Ein zweiter, häufig zu findender Mechanismus zur lokalen Regulation von Gen-Aktivitäten stellt die ATP-abhängige Mobilisierung von Nukleosomen dar (Chromatin-Remodelling-Aktivität). Zahlreiche Komplexe mit zum Teil hoch-konservierten Untereinheiten wurden in Zellen von der Hefe bis zum Menschen beschrieben (Hefe: SWI/SNF; RSC; INO80; ISW1, ISW2; Drosophila: dSWI/SNF, NURF, CHRAC, ACF; Mensch: hSWI/SNF, hCHRAC, RSF, NURD/MeCP1, p400) (Muchardt and Yaniv, 1999).

Sie bewirken eine Verringerung der Assoziation zwischen DNA und den Histon-Proteinen, verschieben Nukleosomen entlang der DNA oder sind an der Entfernung von Histonen aus dem Chromatin beteiligt (Übersichtsartikel: Tsukiyama, 2002).

Einen dritten Mechanismus für die Regulation genetischer Vorgänge auf Chromatinebene stellt die Inkorporation von Histon-Varianten in die Nukleosomen dar (Kamakaka and Biggins, 2005). Einige Varianten ersetzen vorhandene *core*-Histone während der Differenzierung, andere fluktuieren während des Zellzyklusses, sind an der Regulation von Genaktivitäten, an DNA-Reparaturmechanismen oder der X-Chromosom-Inaktivierung beteiligt.

Unter den *core*-Histonen hat H2A die größte Anzahl an Varianten. Hierzu zählen H2A.Z, MakroH2A, H2A-Bbd, H2AvD, und H2A.X. An transkriptioneller Regulation sind die Varianten MakroH2A (Repression) sowie H2A.Z (Aktivierung und Repression) beteiligt. H2A.Z kommt außerdem eine Funktion in der Aufrechterhaltung von Euchromatin-Heterochromatin-Grenzen zu (Meneghini et al., 2003). H2A.X ist ubiquitär exprimiert und verteilt über

das gesamte Chromosom. Es wird in Folge von DNA-Doppelstrangbrüchen lokal phosphoryliert (Rogakou et al., 1998). Diese Modifikation ist essentiell für die Rekrutierung von Reparaturfaktoren wie Rad50, Rad51, und Brca1 zum Ort des DNA-Schaden (Paull et al., 2000).

H2B hat wie H1 sehr wenige Varianten mit sehr speziellen Funktionen. Histon H3 hat zwei vorherrschende Varianten; H3.3 und CENP-A. Während CENP-A im Bereich der Zentrosomen vorliegt, findet man Histon H3.3 meist in Bereichen, die transkriptionell aktiv sind.

1.1.2 Regulation der Polymeraseaktivität

Neben der Regulation der Chromatinstruktur und der Formation des Präinitiationskomplexes ist die Aktivität der Polymerase ein häufiger Angriffspunkt für transkriptionelle Regulatoren. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die C-terminale Domäne (CTD) der großen Untereinheit des RNAPII-Komplexes (Rbp1). Die CTD besteht aus einer Tandem-Wiederholung eines Heptapeptids der Sequenz YSPTSPS. Die Anzahl der Tandemwiederholungen korreliert mit der Komplexität der Genome verschiedener Organismen: Die CTD aus Hefe (*S. cerevisiae*) besteht aus 26 Tandemwiederholungen, die der Fruchtfliege (*Drosophila*) aus 43 und die des Menschen aus 52 (Lewis and Reinberg, 2003). Sie wird innerhalb des Transkriptionszyklusses reversibel phosphoryliert, man findet Serin 2- und Serin 5- Phosphorylierung innerhalb des Heptapeptides (Übersichtsartikel: Dahmus, 1995). Während verschiedener Phasen der Transkription weist die CTD unterschiedliche Phosphorylierungsmuster auf. So ist die Phosphorylierung von Serin 5 eine Voraussetzung für eine effiziente Initiation der Transkription, die darauf folgende Modifikation von Serin 2 wird für die mRNA-Elongation sowie die 3'-Prozessierung der mRNA benötigt (Riedl and Egly, 2000). Die CTD-Phosphorylierungen werden durch die Kinasen Cdk7, Cdk8 und Cdk9 katalysiert (Pinhero et al., 2004; Ramanathan et al., 2001; Washington et al., 2002).

Cdk7/CycH, ein Bestandteil des generellen Transkriptionsfaktors TFII-H, phosphoryliert Serin 5 und spielt eine Rolle beim Übergang von der transkriptionellen Initiation zur Elongation (*Promoter clearance*) (Watanabe et al., 2000).

Cdk8/CycC ist eine fakultative Unterinheit des Mediatorkomplexes und übt einen inhibitorischen Einfluss auf die Aktivität der RNAPII aus (Holstege et al., 1998). Cdk8 phosphoryliert Serin 5 der freien Polymerase und hemmt damit die Assemblierung des Präinitiationskomplexes (Hengartner et al., 1998). Außerdem phosphoryliert Cdk8 die TFII-H-Untereinheit CycH und hemmt damit die Kinaseaktivität dieses generellen Transkriptionsfaktors. Als weitere Substrate von Cdk8 wurden die Mediator-Untereinheit Med2 (Hallberg et al., 2004), TFII-D (Fernandez et al., 2003) sowie einige sequenz-spezifische Transkriptionsfaktoren beschrieben.

Cdk9/CycT ist eine Komponente des Elongationsfaktors P-TEFb. Diese Kinase phosphoryliert Serin-2, ein Marker für transkriptionelle Elongation (Ramanathan et al., 2001; Shim et al., 2002).

Die Dephosphorylierung der CTD erfolgt durch die Phosphatasen FCP1 (Serin-2, Washington et al., 2002) und Ssu72 (Serin-5, (Krishnamurthy et al., 2004).

1.2 Der Mediatorkomplex

1.2.1 Identifikation des Mediatorkomplexes als genereller Kofaktor

Der Mediatorkomplex ist ein im Reich der Metazoa strukturell hoch-konservierter Multiproteinkomplex, der direkt mit der RNAPII interagiert. Die Aktivität des Mediatorkomplexes wurde im Labor von Roger Kornberg erstmals in Hefeextrakten identifiziert, welche benötigt wurde, um in zellfreien (rekonstituierten) Transkriptionssystemen eine Regulierbarkeit der RNAPII durch Aktivatoren zu erreichen (Flanagan et al., 1991; Fondell et al., 1996; Kelleher et al., 1990; Meisterernst et al., 1991).

In den folgenden Jahren wurden zahlreiche Interaktionen zwischen verschiedenen Transkriptionsfaktoren und dem Mediator beschrieben, was darauf hindeutet, dass der Komplex ein Bindeglied zwischen Transkriptionsfaktoren und dem basalen Transkriptionsapparat darstellt.

Der Komplex wurde erstmals aus Hefe (*S. cerevisiae*) aufgereinigt (Flanagan et al., 1991; Kelleher et al., 1990). Zahlreiche Untereinheiten des Komplexes wiesen als dominante Suppressoren eine genetische Interaktion mit einer mutanten Form von Rbp1, der großen Untereinheit der RNAPII mit verkürzter C-terminaler Domäne (CTD) auf (Koleske et al., 1992). Diese genetischen Interaktionen wurden durch die physikalische Interaktion des Mediatorkomplexes mit der CTD von Rbp1 bestätigt (Hengartner et al., 1995). Darüber hinaus wurden Interaktionen des Mediators mit den generellen Transkriptionsfaktoren TFII-E und TFII-H (Sakurai and Fukasawa, 1998) sowie den RNAPII-Untereinheiten Rbp3 und Rbp11 (Davis et al., 2002) beschrieben.

Ein erster funktioneller Zusammenhang zwischen dem Mediator und der RNAPII ergab sich schließlich aus der Beobachtung, dass Mutationen in den Mediator-Untereinheiten Med2 und Med6 die Aktivität der RNAPII *in vitro* und *in vivo* verringern (Lee et al., 1997; Myers et al., 1998), was auf eine Funktion des Mediatorkomplexes als Koaktivator bei der RNAPII-vermittelten Transkription hindeutet.

Für die Komplexuntereinheiten Sin4 und Rgr1, welche in Hefe direkt miteinander interagieren, konnte eine Funktion in der transkriptionellen Repression nachgewiesen werden (Jiang and Stillman, 1992). Beide Faktoren sind negative Regulatoren des HO- sowie des IME1-Gens (Jiang and Stillman, 1992). Auch für die RME1-vermittelten Repression konnte eine Abhängigkeit sowohl von Rgr1 als auch Sin4 gezeigt werden (Covitz et al., 1994; Jiang and Stillman, 1992). Mutationen in Rgr1 und Sin4 in Hefe zeigen den gleichen Phänotyp, und die Überexpression von Rgr1 kann den Phänotyp einer temperatur-sensitiven Sin4-Mutation supprimieren (Jiang and Stillman, 1992).

Eine Mutation der essentiellen Untereinheit Med17/Srb4 in Hefe führt zu einem nahezu kompletten Verlust der RNAPII-Transkription, und Linder und Koautoren konnten zeigen, dass der Verlust von Med17 eine Dissoziation des Multiproteinkomplexes zur Folge hat (Linder et al., 2006). Dies verdeutlicht, dass der Mediator in Hefe für die Regulation nahezu aller protein-kodierenden Gene *in vivo* benötigt wird (Thompson and Young, 1995). Fan et al. (2006) konnten den Komplex nach Chromatin-Immunpräzipitationen in Hefe jedoch nur an einem Teil der von ihnen untersuchten Promotoren nachweisen. Während die Induktion der Gal-Gene mit einer stärkeren Bindung des Mediatorkomplexes korrelierte, zeigte sich bei einer Rap1-vermittelten Induktion der ribosomalen Gene *RPS11B* und *RPS21B* sowie der glykolytischen Gene *CDC19* und *ENO2* keine Mediator-Rekrutierung (Fan et al., 2006).

1.2.2 Strukturelle Konservierung des Mediatorkomplexes

Nachdem der Mediator aus Hefe aufgereinigt wurde, wurden zahlreiche humane Mediatorkomplexe beschrieben. Diese Komplexe (TRAP/SMCC, ARC/DRIP, NAT, CRSP, PC2) variierten zum Teil in Größe und Zusammensetzung ihrer Untereinheiten, enthielten aber alle eine große Anzahl orthologer Proteine zu Untereinheiten des ursprünglichen Hefekomplexes (Abb.1). Eine jüngere Studie hat jedoch gezeigt, dass es sich bei der Vielzahl unterschiedlicher Komplexe in humanen Zellen vermutlich um identische Komplexe aus mindestens 31 Untereinheiten handelt (Sato et al., 2004), wobei die ursprünglichen Unterschiede in der Zusammensetzung wahrscheinlich auf Unterschiede bei der biochemischen Aufreinigung zurück zu führen sind (Conaway et al., 2005; Sato et al., 2004). 28 Untereinheiten des humanen Mediatorkomplexes kommen als Ortholog auch in der Fruchtfliege vor, was auf eine hohe strukturelle Konservierung der Komplexe sowie auf generelle Mechanismen der Genregulation innerhalb des Reiches Metazoa hindeutet (Tabelle 1). 22 der 31 Untereinheiten findet man auch in dem Hefekomplex (Guglielmi et al., 2004).

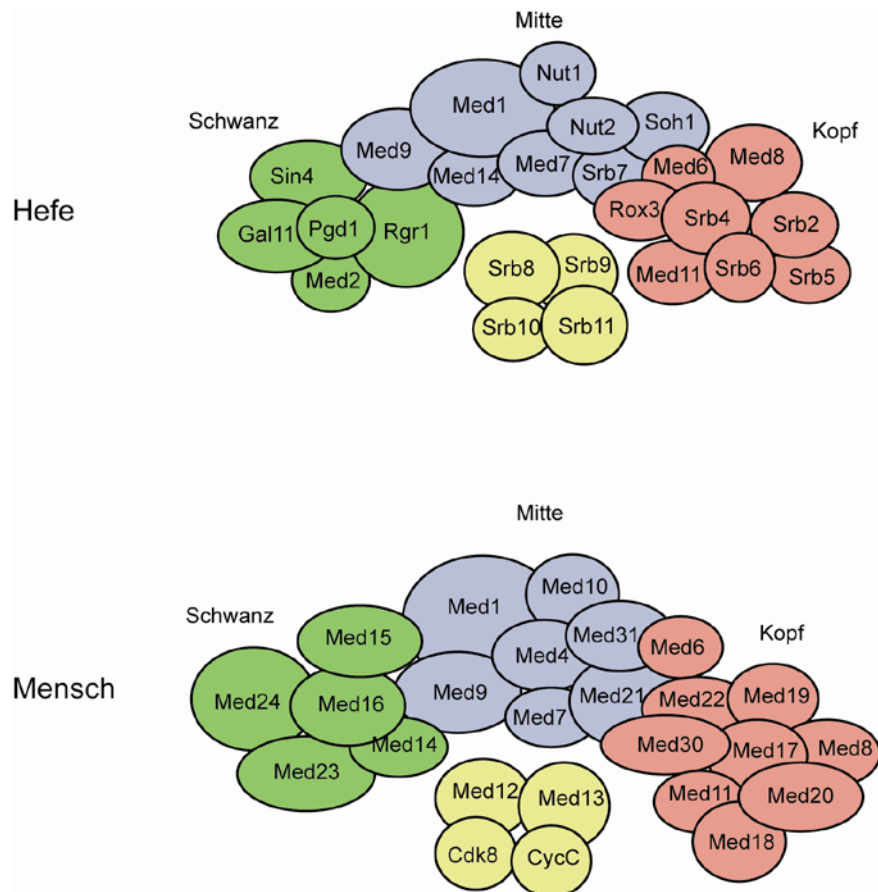


Abbildung 1: Modulare Organisation der Mediator-Komplexe aus Hefe und Mensch. Die Komplexe bestehen aus den drei obligate Modulen Kopf (rot), Mitte (blau) und Schwanz (grün) sowie einem fakultativen Modul (Cdk8/Srb10-Modul, gelb). (Abb. nach Belakavadi und Fondell, 2006).

Der Multiproteinkomplex kann strukturell in Module unterteilt werden (Asturias et al., 1999; Dotson et al., 2000). Die obligaten Module werden als Kopf, Mittelteil und Schwanz bezeichnet. Der Kopfteil ist für die Interaktion des Mediators mit dem RNAPII-Komplex verantwortlich (Takagi et al., 2006), Untereinheiten dieses Moduls aus dem Hefekomplex (hier: Srb4-Modul) wurden ursprünglich als dominante Suppressoren einer CTD-Mutation isoliert (Koleske et al., 1992).

H. sapiens	S. cerevisiae	D. melanogaster
Med1	Med1	Trap220
Med2	Med2	
Med3	Pgd1	
Med4	Med4	Trap36
Med5	Nut1	
Med6	Med6	Med6
Med7	Med7	Med7
Med8	Med8	Arc32
Med9	Med9	CG5134
Med10	Nut2	Nut2
Med11	Med11	Med21
Med12	Srb8	Kto
Med13	Srb9	Skd/Pap/Bli
Med14	Rgr1	Trap170
Med15	Gal11	Arc105
Med16	Sin4	Trap95
Med17	Srb4	Trap80
Med18	Srb5	p28
Med19	Rox3	CG5546
Med20	Srb2	Trfp
Med21	Srb7	Trap19
Med22	Srb6	Med24
Med23		Trap150b
Med24		Trap100
Med25		Arc92
Med26		Arc70
Med27		Trap37
Med28		Med23
Med29		Intersex
Med30		Trap25
Med31	Soh1	Trap18
Cdk8	Srb10	Cdk8
CycC	Srb11	CycC

Tabelle 1: Untereinheiten in den Mediatorkomplexen aus Mensch, Hefe und Fruchtfliege
(Tabelle nach Belakavadi und Fondell, 2006).

Der Mittelteil wurde in Hefe sowohl mit transkriptioneller Aktivierung als auch Repression in Zusammenhang gebracht und ist die Binderegion für ein weiteres Modul (Cdk8-Modul), welches fakultativ an dem Komplex assoziiert (Kang et al., 2001). Der Schwanz bildet zahlreiche Interaktionen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren aus (Tabelle 2).

1.2.3 Aktive und inaktive Form des Mediatorkomplexes

Der Mediatorkomplex kommt in einer großen und einer kleinen Form vor (Malik et al., 2005; Wang et al., 2001). Der kleinen Form fehlt eine Gruppe von Untereinheiten (Med12/Trap230, Med13/Trap240, Cdk8, CycC), welche in Hefe- und in Säugerzellen ein strukturelles Modul (Srb10/Cdk8-Modul) bilden. Zahlreiche Studien, die sowohl den Hefe- als auch den Säuger-Mediatorkomplex betreffen deuten darauf hin, dass das Vorhandensein dieses fakultativen Moduls die inaktive bzw. repressive Form des Mediatorkomplexes darstellt, und die Kinase Cdk8 (bzw. das orthologe Protein aus Hefe, Srb10) wurde als transkriptioneller Repressor beschrieben (Holstege et al., 1998). Zur repressiven Wirkung von Cdk8 werden zahlreiche Mechanismen diskutiert.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass das Cdk8-Modul den Mediatorkomplex sterisch an einer Interaktion mit der RNAPII hindert (Elmlund et al., 2006). Mehrere Berichte beschrieben jedoch die CTD des RNAPII-Komplexes oder Komponenten des Präinitiationskomplexes als Substrat der Kinase Cdk8. So wurde in Hefe gefunden, dass die Cdk8-abhängige Serin-5-Phosphorylierung der CTD die Assemblierung des PIC verhindert (Hengartner et al., 1998). Außerdem wurde ein Mechanismus beschrieben, bei dem Cdk8 durch Phosphorylierung von CycH die Kinaseaktivität von TFII-H und damit die RNAPII-Aktivität nach der PIC-Assemblierung hemmt (Akoulitchew et al., 2000). Gu et al. (1999) konnten zeigen, dass der humane SMCC-Mediatorkomplex *in vitro* auch Polymerasen ohne CTD (den RNAPIIB-Komplex) reprimieren kann, was auf eine CTD-unabhängige Funktion von Cdk8 hindeutet (Gu et al., 1999). In einem rekonstituierten Transkriptionssystem wurde die Repression der PC4-vermittelten Genaktivierung in Gegenwart des Mediators unterdrückt. Bereits in einer früheren Studie wurde beschrieben, dass eine Phosphorylierung von PC4 die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors zur Folge hat (Malik et al., 1998). Tatsächlich konnte eine Phosphorylierung von PC4 durch den SMCC-Mediatorkomplex *in vitro* nachgewiesen werden (Gu et al., 1999).

Weitere Substrate, die *in vivo* durch Cdk8 phosphoryliert werden sind z.B. die Transkriptionsfaktoren Gcn4 und Msn2 (Chi et al., 2001), Gal4 (Hirst et al., 1999), Ste12 (Nelson et al., 2003) sowie die Mediator-Untereinheit Med2 (Hallberg et al., 2004).

In einer genomweiten Analyse zum Bindungsmuster verschiedener Mediator-Untereinheiten in Hefe wurde der Mediatorkomplex gleichermaßen an aktiven als auch an inaktiven Genen nachgewiesen, interessanterweise zeigte sich jedoch keine Korrelation zwischen Cdk8 und der Aktivität von Genen (Andrau et al., 2006). Cdk8 war an allen Loci nachweisbar, an denen der Komplex gebunden hatte, jedoch in schwächerem Maße, was auf eine transiente Bindung des regulatorischen Cdk8-Moduls an den Komplex hinweist. Der Komplex fand sich vor allem an regulatorischen Elementen, wie Promotoren, aber auch *downstream* innerhalb transkribierter Regionen.

1.2.4 Funktionen des Mediatorkomplexes in der Transkription

Die am Besten beschriebene Funktion des Mediator ist die Koaktivierung durch Interaktionen mit regulatorischen Transkriptionsfaktoren einerseits und der RNAPII andererseits (Kornberg, 2005). Die bedeutende Rolle des Mediators für die Aktivierung von Genen konnte im Kontext zahlreicher Transkriptionsfaktoren gezeigt werden. Gut untersuchte Beispiele sind hierbei die Aktivatoren Gal4 sowie GCN4 in Hefe (Bryant and Ptashne, 2003; Qiu et al., 2004). In Säugerzellen sind die nukleären Hormonrezeptoren ein prominentes Beispiel für Aktivatoren, die in ihrer Funktion stark von dem Mediatorkomplex abhängen (Belakavadi and Fondell, 2006; Fondell et al., 1996; Ge et al., 2002).

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass der Mediatorkomplex für eine Aktivator-abhängige Bildung des Präinitiationskomplexes nötig ist, und frühe Studien gingen davon aus, dass der Mediator und die Polymerase einen stabilen Komplex (Holoenzym) bilden und gleichzeitig an den Promotor rekrutiert werden (Kim et al., 1994; Koleske and Young, 1994). Für einige Promotoren konnte jedoch eine Rekrutierung des Mediators vor der RNAPII

nachgewiesen werden (Bryant and Ptashne, 2003; Kuras et al., 2003; Park et al., 2001).

Yudkovsky und Koautoren konnten *in vitro* zeigen, dass der Mediatorkomplex zusammen mit TFII-D, TFII-A, TFII-H und TFII-E während der Elongationsphase ohne die Polymerase am Promotor verbleibt und eine Re-Initiationsplattform ausbildet. Die Wirkung des Aktivators Gal4-VP16 beruht neben der ursprünglichen Rekrutierung des Präinitiationskomplexes zum Promotor später auf der Stabilisierung dieser intermediären Plattform (Yudkovsky et al., 2000).

Daneben wurden weitere Funktionen des Mediatorkomplexes beschrieben, welche spätere Phasen der Transkription betreffen (Wang et al., 2005). Die aktive Form des Mediators verstärkt die TFII-H-abhängige Phosphorylierung der C-terminalen Domäne (CTD) von Rbp1 und erhöht damit die Aktivität der RNAPII. Wird ein *in vitro* Transkriptionsassay nicht durch Zugabe der generellen Transkriptionsfaktoren rekonstituiert, sondern mit Zellextrakten durchgeführt, in denen die TFII-H-Aktivität in der Regel limitiert, ist der Mediatorkomplex durch diese Aktivität in der Lage die basale Transkription zu erhöhen (Nair et al., 2005). Dies gilt jedoch nicht für die inaktiven oder repressiven Form des Mediatorkomplexes, welche Cdk8 enthält, da Cdk8 die TFII-H-abhängige Phosphorylierung der CTD hemmt (Akoulitchev et al., 2000).

In einer jüngst veröffentlichten Studie von Furumoto und Kollegen wurde durch RNA-Interferenz Cdk8 aus humanen Zellen depletiert, was die transkriptionelle Aktivierbarkeit eines Reporterkonstruktes in einem transienten Transkriptionsassay verhinderte, ein Hinweis, dass Cdk8 hier eine Rolle in der Transaktivierung zukommt (Furumoto et al., 2007).

1.2.5 Der Mediatorkomplex interagiert mit zahlreichen Transkriptionsfaktoren

Obwohl der Mediatorkomplex als genereller Kofaktor von globaler Bedeutung für die transkriptionelle Regulation protein-kodierender Gene gilt, zeigten sich bei der Inaktivierung einzelner Untereinheiten des Multiproteinkomplexes sehr unterschiedliche Effekte. So hat die Inaktivierung der Untereinheiten Med2, Med6, Med23 oder Cdk8 eine Deregulation jeweils einer kleinen Gruppe von Genen zur Folge (Ge et al., 2002; Ito et al., 2002; Myers et al., 1999). In einer vor Kurzem veröffentlichten Publikation von Durr und Koautoren wurde gezeigt, dass Mutationen in den Mediator-Untereinheiten Med14, Med24 und Med27 jeweils unterschiedliche Entwicklungsdefekte während der Augenentwicklung in Zebrafisch-Embryonen zur Folge haben (Durr et al., 2006). Das Fehlen der Untereinheit Med1 in Hefe zeigt Defekte in der transkriptionellen Repression sowie Aktivierung der GAL-Gene (Balciunas et al., 1999). Diese zum Teil sehr speziellen Effekte einzelner Komplexuntereinheiten lassen sich dadurch erklären, dass verschiedene Transkriptionsfaktoren den Mediatorkomplex an unterschiedlichen Stellen kontaktieren und somit funktionell von einzelnen Untereinheiten bzw. Modulen abhängen (Übersichtsartikel: Blazek et al., 2005). Eine Auswahl dieser Interaktionen gibt Tabelle 2.

Die Inaktivierung der in Hefe essentiellen Untereinheiten Srb4/Med17 führt dagegen zu einer Deregulation eines breiten Spektrum an Genen sowie zu einer starken Reduktion der mRNA-Synthese insgesamt (Thompson and Young, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass eine Mutation dieser Untereinheit (srb4-138) in Hefe eine Dissoziation des Multiproteinkomplexes zur Folge hat (Linder et al., 2006; Thompson and Young, 1995).

Transkriptionsfaktor	Mediator- Untereinheit	Referenz
p53	Med17/Trap80	(Ito et al., 1999)
VP16	Med17/Trap80 und Med25/Arc92	(Ito et al., 1999; Mittler et al., 2003)
GATA-1	Med1/Trap220	(Stumpf et al., 2006)
verschiedene Kernrezeptoren	Med1/Trap220	(Fondell et al., 1996)
VDR	Med24/Trap100	(Zhang and Fondell, 1999)
E1A	Med23 /Sur2	(Stevens et al., 2002)
Elk-1	Med23/Sur2	(Stevens et al., 2002)
HNF4	Med1/Trap220 und Rgr1	(Malik et al., 2002)
SREBP-1a	Med14/RGR1	(Toth et al., 2004)
c/EBP β	Med23/Sur2	(Mo et al., 2004)
HSF	Med17, Med23/Sur2, Med25/Arc92	(Park et al., 2001)
BRCA1	Med1/Trap220	(Wada et al., 2004)
RTA	Med12/Srb8	(Gwack et al., 2003)
SOX9	Med12/Srb8	(Zhou et al., 2002)
Smad2/3 und Smad 4	Med15/Arc105	(Kato et al., 2002)

Tabelle 2: Beispiele für Interaktionen und funktionelle Abhängigkeiten von Transkriptionsfaktoren zu einzelnen Untereinheiten des Mediatorkomplexes.

Einige Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren und Mediatoruntereinheiten werden über zelluläre Signalwege reguliert. So ist die Bindung von Elk-1 zu Med23/Sur2 von einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors durch die MAP-Kinase abhängig (Stevens et al., 2002). Bei c/EBP β konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung durch den Ras-MAPK-Signalweg eine aktivierende Konformationsänderung des Transkriptionsfaktors zur Folge hat, und die aktive Form von c/EBP β präferentiell die aktive (kleine) Form des Mediatorkomplexes bindet. Die unphosphorylierte, inaktive Form von c/EBP β interagiert zwar weiterhin über Med23/Sur2 mit dem Mediator, jedoch präferentiell die inaktive, Cdk8-haltige Form des Multiproteinkomplexes (Mo et al., 2004).

1.3 Der Transkriptionsfaktor Myc

Im humanen Genom sind ungefähr 3000 verschiedene Transkriptionsfaktoren (sequenz-spezifische Aktivatoren und Repressoren sowie generelle Transkriptionsfaktoren) kodiert (Levine and Tjian, 2003). Während einige der sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren nur zu einer definierten Zeit aktiv sind oder sehr spezielle Funktionen wahrnehmen, gibt es andere, welche Proliferation, Differenzierung und Zelltod regulieren und für die Homöostase vielzelliger Organismus von entscheidender Bedeutung sind. Proteine, die bei einer Überexpression die Entartung der Zellen zur Tumorzelle (Transformation) bewirken können, bezeichnet man als Onkoproteine. Ein solches Onkoprotein ist der sequenz-spezifische Transkriptionsfaktor Myc. Myc wurde ursprünglich als das virale Onkogen (v-myc) des MC29 Stammes des Avian Leukemia Virus (ALV) identifiziert (Sheiness et al., 1978). Dieses Retrovirus induziert neben Karzinomen und Sarkomen die Myelocytomatose in Vögeln, von der MYC seinen Namen trägt.

Mit der Entdeckung eines zellulären Homologs (c-Myc) war Myc neben Src eines der ersten Beispiele viraler Onkogene, die ursprünglich als Proto-Onkogen aus der Wirtszelle stammen und deren onkogenes Potenzial erst durch die Transduktion in das Virusgenom aktiviert wird (Sheiness et al., 1978).

Das humane *c-MYC* Gen besteht aus drei Exons und kodiert für zwei Proteine, welche durch Translationsstartstellen in Exon 1 bzw. Exon 2 hervorgehen. Das größere Protein, dessen Transkription von einem CUG-Startkodon ausgeht, umfasst 453 Aminosäuren. Die Transkription des kleineren Proteins beginnt an einem AUG-Startcodon in Exon 2, ist gegenüber dem größeren Protein N-terminal um 14 Aminosäuren verkürzt und wird wesentlich stärker translatiert als das größere Protein. Die kürzere Form wird im Weiteren c-Myc oder kurz Myc genannt.

c-Myc ist ein Transkriptionsfaktor, der normalerweise streng reguliert ist. In proliferierenden Zellen wird das Myc-Gen nicht zellzyklusabhängig auf niedrigem Niveau, in ruhenden oder differenzierten Zellen gar nicht exprimiert

(Hann et al., 1985). In undifferenzierten Zellen lässt sich die Expression von *MYC* durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren innerhalb von Minuten induziert. Diese rasche Induktion kann auch erfolgen, wenn die Proteinbiosynthese inhibiert ist, *MYC* gehört somit zur Gruppe der *immediate early response* Genen (Almendral et al., 1988; Kelly et al., 1983).

Gene, die aufgrund ihres gemeinsamen Ursprungs eine ähnliche Struktur aufweisen, werden in Genfamilien zusammengefasst. *c-MYC* ist Mitglied einer solchen Genfamilie. Sie ist sehr wahrscheinlich durch Genduplikation entstanden und besteht neben *c-MYC* aus den Mitgliedern *N-*, *L-*, *B-* und *S-MYC*. Für die Entstehung von Tumoren beim Menschen sind besonders *c-MYC*, *L-MYC* und *N-MYC* von Bedeutung (Henriksson and Luscher, 1996). Die Familienmitglieder sind evolutionär hoch-konserviert, werden jedoch zu unterschiedlichen Zeiten in der Entwicklung sowie in unterschiedlichen Kompartimenten, Geweben oder Organen exprimiert (Bull et al., 2001). Funktionell können sich die einzelnen Familienmitglieder teilweise ersetzen (DePinho et al., 1991; Morgenbesser and DePinho, 1994).

Schätzungsweise 70% aller humanen Tumoren weisen eine Aktivierung eines der *MYC*-Gene auf, was ihre herausragende Bedeutung unter den humanen Onkogenen ausmacht (Nilsson and Cleveland, 2003). Die Überexpression von *MYC* kann verschiedene Ursachen haben.

Genamplifikationen. Man findet Amplifikationen z.B. des *MYCN*-Gens in vielen Neuroblastomen oder des *MYCL*-Gens in SCLC-Lungenkrebs (Berwanger et al., 2002; Johnson et al., 1992; Nau et al., 1985; Noguchi et al., 1990).

Erhöhung der Proteinstabilität durch Mutation innerhalb der Proteinkodierenden Gensequenz. Myc ist ein relativ instabiles Protein mit einer Halbwertszeit von 20-30 min. Eine besonders häufige Aminosäuresubstitution (*hot spot*) innerhalb des *c-Myc* Proteins betrifft die Phosphorylierungsstelle Threonin 58, die für den proteasomalen Abbau entscheidend ist (Yeh et al., 2004). Eine Threonin-Alanin-Substitution (T58A) findet man häufig in Burkitt-Lymphomen sowie in onkogen-aktivierten *v-myc* Allelen retroviraler Hühnerviren (Bhatia et al., 1993; Symonds et al., 1989; Yano et al., 1993).

Translokation in die Nähe eines starken Promotors oder Enhancers. Eine Translokation von *MYC* unter den Einfluss des Enhancers für die schwere Immunglobulinkette findet man in 85% aller Burkitt Lymphomen (Gerbitz et al., 1999; Park et al., 2005).

Mutation in übergeordneten Signalkaskaden. Ein Beispiel hierfür ist eine Mutation im APC Signalweg, welche die *MYC* Expression erhöht und eine Rolle in colorektalen Carcinomen (CRC) spielt (He et al., 1998; van de Wetering et al., 2002).

Die biologischen Folgen einer verstärkten Expression von Myc betreffen zahlreiche Aspekte der Tumorentstehung. Hierzu zählen eine Beschleunigung der Proliferation, eine Inhibition der Zelldifferenzierung, die Erhöhung der Zellmasse, eine Inhibition der Zelladhäsion, verstärkte Angiogenese, verstärkte Metastasierung sowie genomische Instabilität (Übersichtsartikel: Adhikary und Eilers, 2005). Bringst man ein exogenes Myc-Allel unter Kontrolle eines starken Promotors in Zellen ein, so findet man i.d.R. unabhängig vom Zelltyp eine erhöhte Proliferationsrate auch ohne Wachstumsfaktoren, eine Erhöhung der Zellmasse sowie Apoptoseinduktion bzw. eine erhöhte Sensitivität gegenüber proapoptotischen Stimuli. Eine Abweichung von diesem stereotypen Reaktionsmuster findet man jedoch bei Keratinozyten. In diesen Hautzellen verhindert Myc die Adhäsion an die Basallamina, was eine frühzeitige Differenzierung und ein Proliferationsstopp zur Folge hat (Gandarillas and Watt, 1997; Gebhardt et al., 2006).

1.3.1 Struktur und konservierte Domänen von Myc

Myc ist ein Transkriptionsfaktor der basischen Region/Helix-Loop-Helix/Leuzin-Zipper (bHLH/LZ)-Familie. Abb.2 zeigt seine Domänenstruktur sowie Bindungsbereiche für Interaktionspartner.

N-Terminal befindet sich die Transaktivierungsdomäne (TAD). Wird diese mit einer heterologen DNA-Bindedomäne verknüpft, ist das chimäre Protein in der Lage, Gene zu transaktivieren. Die TAD umfasst die zwei hoch-konservierten

Elemente Myc-Box I (MB1) und Myc-Box II (MB2), welche ausschließlich in Mitgliedern der Myc-Familie vorkommen (Bar-Ner et al., 1992; Barrett et al., 1992) und für die biologischen Funktionen wie Zellzyklusprogression, Induktion von Apoptose sowie Zelltransformation essentiell ist. Durch die Verwendung verschiedener Deletions- und Punktmutationen innerhalb der TAD konnte gezeigt werden, dass sich diese Funktionen der TAD teilweise voneinander trennen lassen und somit auf verschiedenen Mechanismen beruhen (Oster et al., 2003).

MB1 umfasst zwei Phosphorylierungsstellen, die den 26S-Proteasom-abhängigen Abbau von Myc regulieren (Sears et al., 2000). Eine Aminosäuresubstitution der Phosphorylierungsstelle Threonin 58 findet man häufig in Burkitt-Lymphomen sowie in onkogen-aktivierten v-myc Allelen retroviraler Hühnerviren, sie führt zu einer Erhöhung der Proteinstabilität (Bhatia et al., 1993; Yano et al., 1993). Eine Myc-Mutante mit einer Deletion der MB1 zeigt außerdem in transienten Reporterassays eine Verringerung in der Transaktivierung (Amin et al., 1993).

MB2 ist die Binderegion für mehrere Kofaktoren und Kofaktor-Komplexe. Die Deletion dieser Region führt in transienten Reporterassays bei unveränderter Aktivierbarkeit zu einer Verminderung der Transrepression des ADML (Adenovirus-2-major late)-Promotors sowie zu einem Verlust der Ko-Transformation von REF-Zellen mit Ras (Li et al., 1994). Bei der Regulation endogener Zielgene zeigte sich bei einem Teil von Myc-Zielgenen eine MB2-abhängig (Nikiforov et al., 2002).

Ein weiterer, hoch-konservierter Bereich, Myc-Box III (MB3) befindet sich in der zentralen Region des Proteins und ist erforderlich für die transkriptionelle Repression und Transformation durch Myc (Herbst et al., 2005).

In der zentralen Region befinden sich zwei Kernlokalisationssignale (Nuclear Localisation Signal, NLS: Aminosäuren 320-328 und schwächer 364-374), die für die Lokalisation von Myc in den Zellkern verantwortlich sind (Dang and Lee, 1988).

C-Terminal befindet sich die hoch-konservierte bHLH/LZ-Domäne, für alle bekannten Funktionen von Myc essenziell ist. Über die basische Region erfolgt die sequenz-spezifische DNA-Bindung, die HLH/LZ-Domäne vermittelt eine Heterodimerisierung mit dem Partnerprotein Max (Amati et al., 1993a; Amati et al., 1993b; Blackwood and Eisenman, 1991; Littlewood et al., 1992).

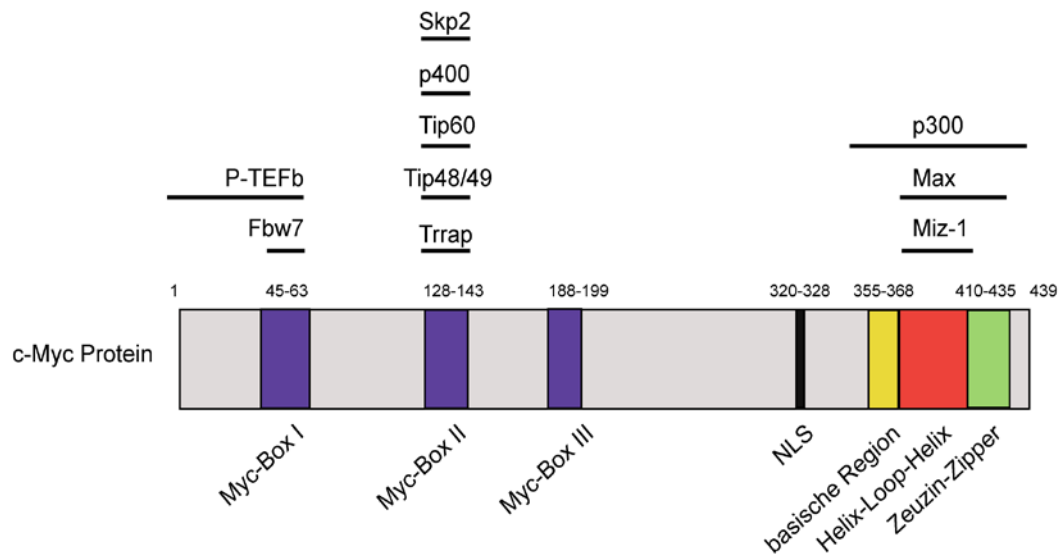


Abbildung 2: Domänen innerhalb des Myc-Proteins und Interaktionspartner von Myc. N-Terminal findet man die Transaktivierungsdomäne mit den hoch-konservativen Regionen Myc-Box I und Myc-Box II, wobei vor allem Myc-Box II Binderegion für zahlreiche Kofaktoren ist. Der C-Terminus vermittelt DNA-Bindung und die Interaktion mit Max.

1.3.2 Das Myc/Max/Mad-Netzwerk

Alle Mitglieder der Myc-Familie interagieren mit dem obligaten Heterodimerisierungspartner Max (Myc-associated X-Factor) (Amati et al., 1993a; Amati et al., 1993b). Max ist wie Myc ein HLH-Protein und trägt eine DNA-Bindedomäne, verfügt jedoch über keine Transaktivierungsdomäne. Max wird konstitutiv und im Vergleich zu Myc stark exprimiert. *In vivo* liegt Myc ausschließlich als Komplex mit Max vor. Strukturanalysen haben ergeben, dass es sich um ein antiparalleles Tetramer handelt (Nair and Burley, 2003).

Myc/Max-Komplexe binden an spezifische DNA-Elemente der Sequenz CAC(G/A)TG (Enhancer-Boxen, E-Boxen), rekrutieren Kofaktoren und aktivieren die Transkription des betroffenen Zielgens (Amati et al., 2001; Frank et al., 2003; McMahon et al., 2000).

Max interagiert alternativ zu Myc mit Mitgliedern der Mad-Familie (Mad1, Mxi1, Mad3, Mad4), die als Gegenspieler der Myc-Familie gilt. Mad-Proteine sind hauptsächlich in nicht-proliferierenden Zellen exprimiert. Mad/Max-Komplexe binden an dieselben E-Boxen wie Myc/Myc-Komplexe, fungieren hier allerdings als Repressoren. Die Mad-Proteine rekrutieren hierzu einen Sin3-HDAC-Repressorkomplex (Sommer et al., 1997). Mitglieder der Mad-Familie inhibieren die Expression von Reportergenen, die durch Myc aktiviert werden, verhindern die Transformation von Ratten-Fibroblasten, blockieren Zellwachstum und induzieren Differenzierung (Henriksson and Luscher, 1996).

In proliferierenden Zellen überwiegen die Komplexe aus Myc und Max, in ruhenden oder arretierten Zellen die aus Mad und Max. Die DNA- und Max-Bindungen sind essentiell für die onkogene, mitogene und die proapoptische Funktion von Myc (Amati et al., 1993a; Henriksson and Luscher, 1996).

Die Depletion von Mnt (einem Mitglied der Mad-Familie) zeigt einen ähnlichen Phänotyp wie eine Myc-Aktivierung (Nilsson et al., 2004). Da dieser Phänotyp auch in Zellen ohne Myc-Expression zu beobachten ist, ist es möglich, dass die Depression von Mnt-reprimierten Genen eine Schlüsselfunktion von Myc darstellt.

1.3.3 Transkriptionelle Regulation durch Myc

Myc ist ein Transkriptionsfaktor, der zahlreiche Gene aktivieren oder reprimieren kann. Innerhalb des N-Terminus des Myc-Proteins wurde sowohl eine Transaktivierungs- als auch eine Transrepressiondomäne beschrieben, die sich überlappen (Li et al., 1994). Da es Myc-Mutanten gibt, die defizient

entweder in der Transaktivierung oder Transrepression bestimmter Zielgene sind, handelt es sich möglicherweise um unabhängige Mechanismen (Oster et al., 2003, (Conzen et al., 2000; Li et al., 1994). Darüber hinaus scheinen beiden Funktionen zum Teil aktive Regulationsmechanismen zugrunde zu liegen, denn sowohl für die Transaktivierung als auch die Transrepression wurde bei einigen Zielgenen Abhängigkeit von der MycBox 2 beschrieben, die als Binderegion für zahlreiche Kofaktoren beschrieben wurde (Conzen et al., 2000; Li et al., 1994).

Der Einsatz von genomweiten Screens wie Microarray-, SAGE- (serial analysis of gene expression) und ChIP on Chip-Analysen führte in den letzten Jahren zur Identifikation eine große Anzahl potenzieller Zielgene von Myc, die an vielen verschiedenen zellulären Stoffwechselprozessen und Signalwegen beteiligt sind (Fernandez et al., 2003; Mao et al., 2003; Menssen and Hermeking, 2002; O'Connell et al., 2003; Orian et al., 2003; Patel et al., 2004b; Schuldiner and Benvenisty, 2001; Watson et al., 2002; Zeller et al., 2003; Zeller et al., 2006).

Die Überlappung der Ergebnisse aus den unterschiedlichen Analysen ist jedoch in vielen Fällen gering. Als Ursachen hierfür werden Unterschiede die zum Teil erheblich variierenden Expressionslevel von Myc in den verschiedenen Zellsystemen diskutiert. So können unphysiologisch hohe Myc-Level (wie sie häufig in Myc-transformierten Zellen vorkommen) eine Bindung und Regulation von Genen zur Folge haben, die durch physiologische Mengen nicht reguliert würden.

Ein wichtiger Aspekt bei der Beurteilung von Zielgenen ist die Unterscheidung von direkter und indirekter Genregulation. Als direktes Zielgen wird ein Gen definiert, dessen Expression unmittelbar durch die Bindung von Myc an den regulatorischen Sequenzen reguliert wird. Gene, die durch Myc-Zielgene erst nach *de novo*-Proteinsynthese bzw. als Konsequenz von Myc-induzierten Vorgängen wie z.B. Zellzyklus-Progression reguliert werden, bezeichnet man als indirekte Zielgene. Als strenges Kriterium für direkte Zielgene gilt die Fähigkeit, Myc in Chromatinimmunpräzipitationsexperimenten (ChIPs) an den *consensus*-Bindestellen nachweisen zu können.

Ausgehend von Immunpräzipitationen der von Myc-gebundenen, genomischen Sequenzen mit anschließenden Genom-Microarrays (ChIP on Chip-Analysen) wurde abgeschätzt, dass ungefähr 10% aller Gene innerhalb des Genoms von Mensch und Fliege (*Drosophila melanogaster*) direkt von Myc gebunden werden (Fernandez et al., 2003; Orian et al., 2003).

Die Verhältnisse von aktivierten und reprimierten Genen sind je nach verwendetem System unterschiedlich; typischerweise werden 10-25% aller Myc-Zielgene reprimiert (Zeller et al., 2003). Eine Datenbank mit potenziellen Zielgenen unter Berücksichtigung der experimentellen Hintergründe findet man auf der Webseite www.myc-cancer-gene.org.

Zahlreiche Untersuchungen deuten darauf hin, dass die biologischen Effekte von Myc nicht über einen kritischen Effektor, sondern über ein breites Spektrum von Zielgenen vermittelt werden (Bernard and Eilers, 2006). Neben den protein-kodierenden Genen spielen auch rRNA- und tRNA-kodierende Gene eine Rolle. Außerdem kann Myc mikroRNAs aktivieren, welche an der Regulation von Zielgenen beteiligt sind. So konnte für das Myc-aktivierte Zielgen E2F1 gezeigt werden, dass Myc die Expression dieses Gens zusätzlich über die Induktion einer mikroRNA negativ reguliert (O'Donnell et al., 2005).

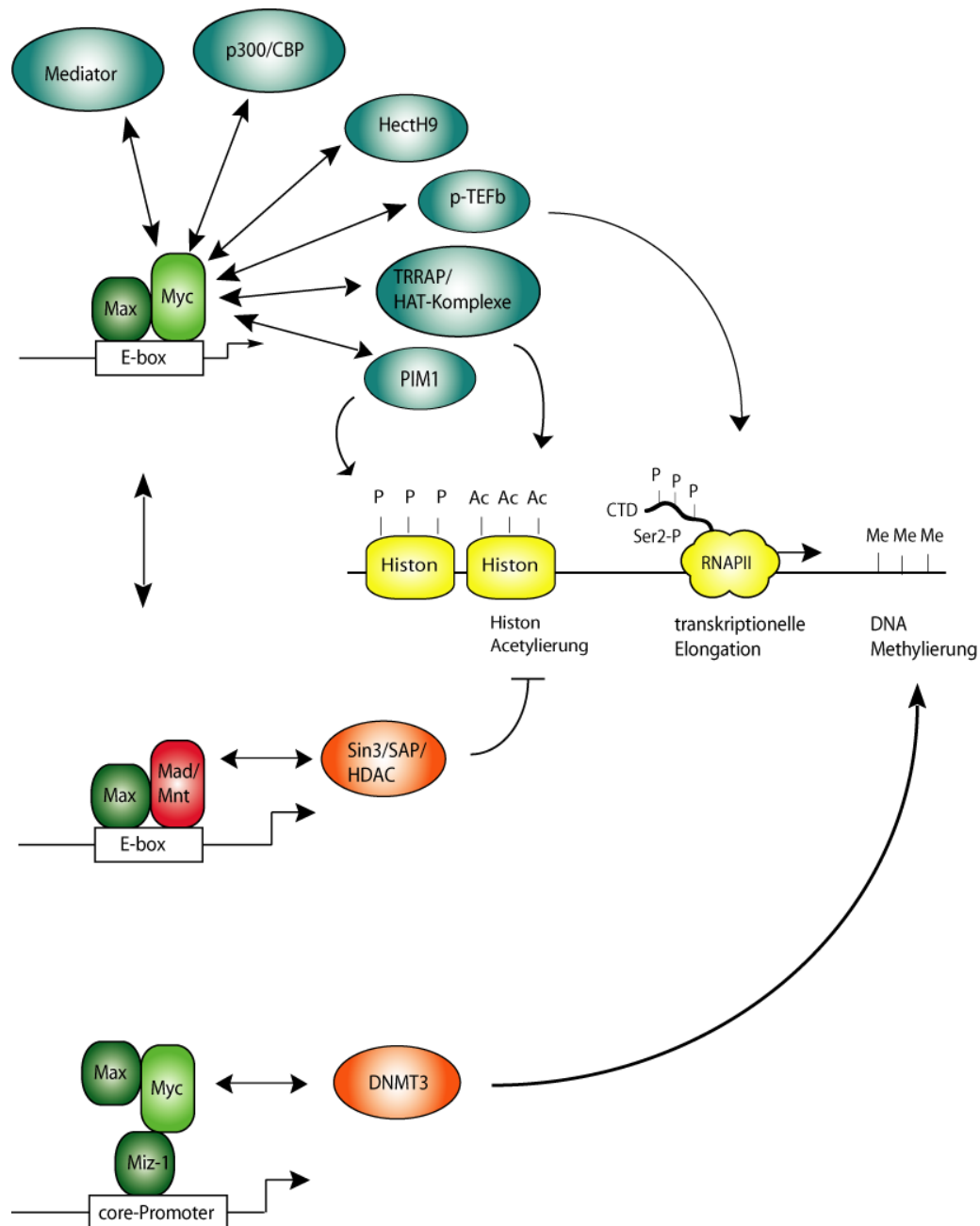


Abbildung 3: Myc-Komplexe und transkriptionelle Regulation. Die Aktivierung und Repression von Myc-Zielgenen erfolgt über verschiedene Proteinkomplexe und Mechanismen (nach Bernard und Eilers, 2006).

1.3.3.1 Mechanismen der Myc-vermittelten Transaktivierung

Die mechanistisch am Besten untersuchte Funktion von Myc ist die Transaktivierung seiner Zielgene, sie hängt in allen Fällen von der DNA-Bindung sowie von der Heterodimerisierung mit dem Partnerprotein Max ab.

Myc/Max-Komplexe binden an E-Boxen der Sequenz CACGTG. Alle direkt aktivierten Zielgene weisen E-Boxen in ihren Enhancer oder Promotorregionen auf. Umgekehrt werden jedoch nicht alle im Genom vorhandenen E-Boxen, die statistisch ca. alle 4000bp vorkommen, *in vivo* von Myc/Max-Komplexen besetzt (Fernandez et al., 2003; Orian et al., 2003).

Die Umgebung der von Myc gebundenen E-Box-Sequenzen weist häufig eine hohe phylogenetische Konservierung auf (Haggerty et al., 2003), und die Lokalisation einer E-Box innerhalb einer CpG-Insel (genomische Bereiche mit hoher CG-Dinukleotiddichte) erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Besetzung durch den Myc/Max-Komplex erheblich (Fernandez et al., 2003). Eine ChIP on Chip-Analyse mit humanen HL60-Zellen, in der Chromatinimmunpräzipitationen mit einem CpG-Insel-Microarray kombiniert wurde, zeigte eine Bindung von Myc an ca. 3% aller Gene mit CpG-Inseln im Promotor (Mao et al., 2003). Durch Chromatinimmunpräzipitationen in Kombination mit einer methylierungssensitiven Restriktionsanalyse konnte Perini und Kollegen für N-Myc zeigen, dass eine Methylierung des CpG-Dinukleotides innerhalb der E-Box die Myc-Bindung *in vivo* verhindert (Perini et al., 2005). Daneben konnte eine strenge Korrelation zwischen einer Myc-Bindung und dem Vorhandensein spezifischer Chromatinmodifikationen nachgewiesen werden (Guccione et al., 2006). Myc-Bindung (an E-Boxen und nicht E-Boxen) fanden sich in dieser Studie ausschließlich in sogenannten euchromatischen Inseln, die sich durch H3-Methylierung (K4 und K79) sowie Histon H3-Acetylierung auszeichnen.

Neben DNA- und Maxbindung ist die N-terminale Transaktivierungsdomäne und die Kofaktor-bindende Region MB2 für die Aktivierung eines Teils endogener Zielgene entscheidend. Als erster MB2-interagierender Faktor wurde das 430kDa große Ttrap identifiziert (McMahon et al., 1998). Die

Expression eines dominant-negativen Trrap-Fragmentes hemmt die Transformation durch Myc (McMahon et al., 1998).

Trrap ist Untereinheit von mindestens zwei verschiedenen Histon-Acetyltransferase (HAT)-Komplexen, dem GCN5/PCAF- Komplex sowie dem TIP60/Nu4A- Komplex (Ikura et al., 2000; Sterner and Berger, 2000).

Beide Histonacetyltransferasen (Tip60 und Gcn5) interagieren *in vivo* mit dem Myc-Protein (Frank et al., 2003; McMahon et al., 2000), Tip60 konnte darüber hinaus zusammen mit weiteren Untereinheiten des Tip60-Komplexes (Trrap, Tip48, Tip49 und p400) in ChIP-Experimenten an genomischen Myc-Bindestellen nachgewiesen werden (Frank et al., 2003).

In ChIP-Experimenten konnte nach einer Myc-Induktion außerdem eine Erhöhung der Histon-Acetylierung sowohl an Histon H3 als auch an Histon H4 an den Promotoren aktivierter Myc-Zielgene beobachtet werden, und diese Acetylierung war im Falle des Zielgens *Cyclin D2* MB2-abhängig (Amati et al., 2001; Bouchard et al., 2001; Fernandez et al., 2003; Frank et al., 2001). Die Überexpression eines enzymatisch inaktiven Tip60-Proteins verursachte eine Verzögerung der Myc-induzierten Histone H4-Acetylierung (Frank et al., 2003). Neben lokalen Effekten auf die Chromatinstruktur übt Myc auch einen globalen Einfluss auf Histon-Acetylierung aus, möglicherweise über eine transkriptionelle Aktivierung der Histon-Acetyltransferase Gcn5 (Knoepfler et al., 2006).

Die Funktion der Myc-bindenden HAT-Komplexe könnte neben der Histonacetylierung auch in der Acetylierung des Myc-Proteins selber liegen. Tatsächlich wurde *in vivo* eine Acetylierung von Myc sowohl durch Gcn5 als auch Tip60 berichtet (Patel et al., 2004a). Die Modifikation hat eine starke Erhöhung der Proteinstabilität zur Folge.

Neben einer HAT-Aktivität verfügt der Tip60-Komplex über eine weitere Aktivität, welche ATP-abhängig die Mobilisierung von Nukleosomen katalysiert (Chromatin-Remodelling-Aktivität) (Ikura et al., 2000). Möglicherweise wird diese Funktion des Multiproteinkomplexes von den

evolutionär hoch-konservierten ATPasen/Helikasen Tip48/Tip49 vermittelt. Ihre enzymatische Aktivität spielt für Myc eine maßgebliche Rolle, denn eine ATPase-defiziente Mutante von TIP49 wirkt dominant-negativ auf die onkogene und proapoptotische Aktivität von Myc (Dugan et al., 2002; Wood et al., 2000). Der Beitrag, den die beiden ATPasen an der transkriptionellen Regulation von Myc leisten ist jedoch noch unklar. So konnte in *Drosophila* zwar eine genetische Interaktion zwischen Mutationen in Tip48/Tip49 und Myc nachgewiesen werden, die Deregulation von Zielgenen bei diesen Mutationen zeigte jedoch nur sehr geringe Überlappung (Bellosta et al., 2005). Tip48 und Tip49 interagieren Ttrap-unabhängig mit der MB2 von Myc und wurden neben dem Tip60-Komplex in einem weiteren, distinkten Proteinkomplex aufgereinigt, der mit der Transaktivierungsdomäne von Myc assoziiert und das Aktin-ähnliche Kernprotein Baf53 sowie β -Aktin enthält (Park et al., 2002). Wie Tip48/Tip49 scheint auch Baf53 entscheidend für das onkogene Potential von Myc zu sein, da die Koexpression von verschiedenen Baf53-Deletionsmutanten die Transformation embryonaler Rattenfibroblasten durch c-Myc und H-Ras blockiert (Park et al., 2002).

In *Drosophila* konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass der Tip60-Komplex eine Rolle im Histon-Austausch bei der DNA-Schadensreparatur hat (Kusch et al., 2004). Der Tip60-Komplex acetyliert phosphoryliertes H2Av (das Ortholog von H2A.X) und ersetzt es durch eine unphosphorylierte Variante. Der Histon-Austausch wird hierbei durch p400/Domino katalysiert. Auch in Hefe ist das orthologe Protein von p400 (Swr1) für den Austausch von Histonvarianten verantwortlich. In humanen Zellen wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie der SRCAP-Komplex, der dem Swr1-enthaltenden Hefekomplex ähnelt, für den Austausch von H2A.Z verantwortlich gemacht (Ruhl et al., 2006). Der humane SRCAP-Komplex enthält zwar kein p400, teilt aber einige Untereinheiten mit dem Tip60-Komplex und enthält zahlreiche Proteine, die zuvor als Kofaktoren für Myc beschrieben wurden (Tip48, Tip49, Baf53, β -Aktin, YL1) (Cai et al., 2005; Ruhl et al., 2006). Tatsächlich konnte nach Aktivierung eines Myc-ER-Allels durch 4-OHT in Mauszellen ein Austausch von H2A.Z beobachtet werden (Till Kortüm, persönliche Mitteilung). Ob diese bisher nicht beschriebene Funktion von Myc über den

bekannten Myc-Kofaktorkomplex Tip60 oder durch SRCAP vermittelt wird ist bisher unklar. Die biologische Relevanz dieser Funktion von Myc ist ebenfalls noch nicht geklärt.

In einer jüngst veröffentlichten Studie von Zippo et al. (2007) wurde die Serin/Threonin-Kinase Pim1 als ein weiterer MB2-bindender, jedoch Trapp-unabhängiger Kofaktor von Myc beschrieben (Zippo et al., 2007). Pim1 wurde ursprünglich in einem Screen isoliert, der bei Überexpression die Lymphomagenese von E μ -Mäusen, welche konstitutiv ein myc-Allel unter dem Enhancer der schweren Immunglobulinkette exprimieren, verstärkt (van Lohuizen et al., 1991). Pim1 wird von Myc MB2-abhängig zu E-Boxen rekrutiert, phosphoryliert dort lokal Serin 10 von Histon H3 und bewirkt damit die Aktivierung der Zielgene (Zippo et al., 2007). Nach einer Depletion von Myc bzw. Pim1 in HEK293-Zellen konnte in Microarray-Experimenten gezeigt werden, dass ca 20% der durch Myc-regulierten Gene in ihrer Expression von Pim1 abhängen. Die Depletion von Pim1 verhinderte bei immortalisierten Ratten Fibroblasten (Rat1-Zellen) die Myc-induzierte morphologische Transformation sowie die Myc-induzierte Fähigkeit zu Wachstum in Weichagar (Hoang et al., 1994). Durch die Verwendung chimärer Proteine, bei denen Pim1 mit dem N-Terminus von Myc-Allelen fusioniert wurde, konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Rekrutierung der Pim1-Kinaseaktivität ausreicht, um die MB2-Abhängigkeit bei der Transformation durch Myc in diesem Assay zu überkommen. Dies deutet darauf hin, dass die Rekrutierung von Pim1 und die Pim1-vermittelte Histonmodifikation von Myc-Zielgenen eine Schlüsselrolle für die MB2-abhängige Transformationsaktivität von Myc spielt. Für die Kooperation zwischen Myc und Pim1 in der Lymphomagenese wurden jedoch auch andere Mechanismen beschrieben, wobei Pim1 über die Inhibition von Apoptose die transformierende Aktivität von Myc verstärkt (Mochizuki et al., 1997).

Bei der Transaktivierung von Myc konnte nur bei einem Teil der Myc-Zielgene eine MB2-Abhängigkeit beobachtet werden (Nikiforov et al., 2002; Zhang et al., 2006), und eine Myc-induzierte Erhöhung der lokalen Histon-H3 und -H4 Acetylierung wurde an zahlreichen, aber nicht allen untersuchten

Myc-Zielgenen gefunden (Frank et al., 2003). In transienten Reporterassays ist die Transaktivierung von E-Box-Promotoren durch Myc ebenfalls unabhängig von der hoch-konservierten MB2 (Bello-Fernandez et al., 1993; Kato et al., 1990).

Das Gen *Cad* (Carbamoyl-Phosphatatsynthase/Aspatat-Transcarbamoylase/Dihydroorotase) ist ein Beispiel für ein Myc-Zielgen, dessen Transaktivierung MB2-unabhängig erfolgt und an dessen Promotorregion auch keine Myc-induzierte Histon-Acetylierung zu beobachten ist (Eberhardy and Farnham, 2002). In ChIP-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Myc vielmehr eine Hyperphosphorylierung von Serin 2 der CTD des RNAPII-Komplexes verursacht. Diese Modifikation der RNAPII ist ein Marker für die transkriptionelle Elongation und wird durch den positiven transkriptionellen Elongationsfaktorkomplex b (P-TEFb) vermittelt. Tatsächlich konnte eine *in vitro* Interaktion zwischen Cyclin T1 und Cdk9, Bestandteile des CTD-Kinasekomplexes P-TEFb, und c-Myc nachgewiesen werden (Eberhardy and Farnham, 2001). Ein weiterer Kofaktor, der MB2-unabhängig mit Myc interagiert ist p300. In transienten Transkriptionsassays wurde p300 als positiver Kofaktor von Myc beschrieben (Vervoorts et al., 2003). Welche Funktion p300 bei der Myc-vermittelten Transaktivierung hat ist jedoch unklar. p300 ist in der Lage Histone sowie Nicht-Histonproteine zu acetylieren und *In vitro* konnte gezeigt werden, dass p300 c-Myc acetyliert (Vervoorts et al., 2003).

Die Ubiquitinierung von Transkriptionsfaktoren spielt neben ihrer Funktion für den Proteinabbau eine Rolle bei der transkriptionellen Regulation. Sie ermöglicht entweder über die Rekrutierung von nuklearen Proteasomen und die Degradation von DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren einen raschen Austausch von Komplexen an den regulatorischen Elementen der Zielgene oder dient als Marker für die Rekrutierung von Kofaktoren.

E3-Ligasen sind Enzyme, welche die zu ubiquitinierenden Proteine spezifisch binden. Myc interagiert mit mehreren E3-Ligasen: Skp2, Fbw7 und HectH9. Für alle drei Proteine konnte ein Einfluss auf die genregulatorischen

Eigenschaften von Myc gezeigt werden (Adhikary and Eilers, 2005; Amati, 2004; von der Lehr et al., 2003).

Am Besten untersucht ist hierbei die Funktion von HectH9 auf die Myc-vermittelte Transaktivierung. In einer kürzlich veröffentlichten Studie aus unserem Labor konnte gezeigt werden, dass HectH9 mit dem C-Terminus von Myc interagiert und Myc ubiquitinyliert, was eine Voraussetzung für die Bindung des Koaktivators p300 ist (Adhikary et al., 2005).

Schließlich interagiert Myc auch mit Komponenten des basalen Transkriptionsapparates und könnte hierdurch direkt zur Formation des Präinitiationskomplexes beitragen. So wurde eine Interaktion zwischen Myc und TBP, einer Untereinheit des generellen Transkriptionsfaktors TFII-D *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen (Hateboer et al., 1993; Maheswaran et al., 1994). In genomweiten ChIP-Analysen wurde entsprechend eine enge Kolokalisation von Myc und TFII-D gefunden (Li et al., 2003).

Auch die RNAPIII-Transkription wird durch Myc aktiviert (Gomez-Roman et al., 2003). Die genomischen Bindestellen enthalten jedoch in aller Regel keine E-Boxen, die Bindung erfolgt hierbei möglicherweise über eine Interaktion mit TFIII-B.

1.3.3.2 Myc-vermittelte Transrepression

Bei Überexpression von Myc werden zahlreiche Gene reprimiert (Claassen and Hann, 1999; Facchini and Penn, 1998). Unter den in Myc-transformierten Zellen reprimierten Genen findet man zahlreiche, die für Zelladhäsionsproteine kodieren (Judware and Culp, 1995). Auch Zellzyklusregulatoren wie das CCAAT/enhancer-binding protein alpha c/EBP α (Antonson et al., 1995; Freytag and Geddes, 1992), p21CIP1 (CDKN1A, p21) (Herold et al., 2002), p15INK4b (Staller et al., 2001) oder Myc selber (Penn et al., 1990) sind Myc-reprimierte Gene.

Viele dieser Gene stehen in Zusammenhang mit zellulärer Transformation, was darauf hindeutet, dass die Fähigkeit zur Repression von Zielgenen einen entscheidenden Anteil an dieser Funktion des Myc-Proteins trägt (Claassen und Hann, 1999; (Lee et al., 1996; Marhin et al., 1996).

Mechanistisch ist die Myc-vermittelte Repression noch nicht umfassend verstanden. Humane primäre Fibroblasten mit einem induzierbaren *Myc-ER*-Allel zeigten in einer Microarray-Studie von Collier und Kollegen nach Aktivierung des Myc-ER-Proteins zahlreiche Gene auch bei gleichzeitiger Hemmung der *de novo* Proteinsynthese reprimiert, was auf einen direkten Repressionsmechanismus hinweist (Collier et al., 2000). Außerdem ist die Repression in vielen Fällen von der hoch-konservierten Region MB2 abhängig, die die Binderegion für mehrere Myc-Kofaktoren darstellt und auf eine Beteiligung von Kofaktoren an dem Repressionsprozess hindeutet (Li et al., 1994; Marhin et al., 1997).

Für den *AdML* (*Adenovirus-2 major late*)-Promotor wurde erstmals ein Mechanismus beschrieben, wonach Myc über ein *core*-Promotorelement, den Initiator (INR), die Repression *in vivo* vermittelt (Lee et al., 1996; Li et al., 1994). INR-Elemente sind häufig in TATA-losen Promotoren zu finden und weisen die sehr schwache Konsensussequenz YYCAYYYYY (Y steht für eine Pyrimidinbase) auf (Smale and Baltimore, 1989). Auch für die Gene *c/EBPα*, *Cyclin D1*, *Albumin*, *TdT*, und *p15* wurde eine INR-Abhängigkeit bei der Myc-vermittelten Repression beschrieben (Li et al., 1994; Mai and Martensson, 1995) wobei Myc diese Gene wahrscheinlich nicht direkt, sondern über andere INR-bindende Transkriptionsfaktoren wie TFII-I (Roy et al., 1993), YY-1 (Zhao et al., 1998), SP1 (Gartel et al., 2001) und Miz-1 (Peukert et al., 1997; Seoane et al., 2001; Staller et al., 2001) bindet (Sakamuro and Prendergast, 1999).

Am Besten beschrieben ist der Repressionsmechanismus über die Bindung des Transkriptionsfaktors Miz-1 (Myc-interacting-Zinkfinger 1). Ein Beispiel für die Repression eines Miz-1-Zielgens durch Myc ist die Repression von *p15INK4b* (Staller et al., 2001). Die Expression von *p15INK4b* wird durch die Bindung von Miz-1 an das INR-Element aktiviert. Myc bindet Miz-1 und

inhibiert so die Aktivierung des Gens. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Myc an Miz-1 die Interaktion zwischen Miz-1 und dessen Kofaktor p300 reduziert (Peukert et al., 1997).

Die Interaktion zwischen Myc und Miz-1 erfolgt über die äußere Seite der C-terminalen HLH-Domäne des Myc-Proteins, und der C-Terminus von Myc ist in transienten Transkriptionsassays ausreichend für Repression der Miz-1-vermittelten Aktivierung (Peukert et al., 1997). Es konnte darüber hinaus eine Punktmutante von Myc isoliert werden, die zwar noch mit Max interagiert und Zielgene transaktiviert, nicht aber an Miz-1 binden kann und in der Repression z.B. von *p21CIP1* defizient ist (Wu et al., 2003). Dieser Mechanismus erklärt jedoch nicht, warum die Myc-vermittelte Repression in zahlreichen Fällen abhängig von der hoch-konservierten Region MB2 ist.

Möglicherweise spielen deshalb MB2-bindende Kofaktoren neben der Transaktivierung auch eine Rolle für die Myc-vermittelte Repression. So zeigte sich im Expressionsprofil von Zellen eines konditionalen Trapp-knockouts ein erheblicher Anteil (30%) aller deregulierten Gene hochreguliert, was Trapp möglicherweise eine Funktion in der Repression dieser Gene zuweist (Herceg et al., 2003). Eine Studie an *Xenopus*-Embryonen zeigte, dass die proliferativen Funktionen von Reptin und Pontin (die Orthologen der MB2-bindenden Myc-Kofaktoren TIP48 und TIP49) von der Interaktion zwischen Myc und Miz-1 abhängen, was auf eine Beteiligung der hoch-konservierten ATPasen an der Myc-vermittelten Repression in *Xenopus* hindeutet (Etard et al., 2005). Während die Funktionen von Reptin und Pontin hierbei synergistisch und proliferationsfördernd wirken, üben sie in *Drosophila* einen gegensätzlichen Effekt auf die dMyc Funktionen aus (Bellosta et al., 2005). Während dTIP49 die untersuchten Myc-Effekte positiv beeinflusst, zeigt TIP48 einen negativen Effekt auf die Myc-Funktionen. Auch in der embryonalen Entwicklung von Zebrafischen üben Reptin und Pontin einen gegensätzlichen Effekt auf die Herzentwicklung aus (Rottbauer et al., 2002).

In einer Studie von Brenner und Kollegen zur Myc-vermittelten Repression des Zielgens *p21CIP1* in humanen Zellen wurde weiterhin gezeigt, dass Myc

zusammen mit Miz-1 und der DNA-Methyltransferase Dnmt3a einen ternären Komplex bilden, und dass Dnmt3a über DNA-Methylierung zur Repression des *p21*-Promotors beiträgt (Brenner et al., 2005).

Myc reprimiert einige Zielgene wie *Gadd45* oder *Pdgfr β R* auch unabhängig von INR-Elementen (Izumi et al., 2001). *Gadd45*, ein Gen ohne INR-Element in seinem *core*-Promotor, das bei DNA-Schädigung induziert wird, wird möglicherweise durch eine direkte Interaktion von Myc und den Transkriptionsfaktoren Sp1/Sp3 reprimiert (Amundson et al., 1998). Der Repressionsmechanismus greift nicht bei der Formation des Preinitiationskomplexes an, die Besetzung des *Gadd45*-Promotors mit dem Polymerase-Komplex erfolgt vielmehr in Gegenwart von Myc unvermindert (Barsyte-Lovejoy et al., 2004). Die Repression des *Pdgfr β R*-Gens erfolgt möglicherweise über eine Interaktion von Myc und NF-Y (Izumi et al., 2001).

Durch die Verwendung verschiedener Myc-Allele mit Punktmutationen bzw. Deletionen innerhalb des N-Terminus lässt sich die Fähigkeit von Myc zur Repression INR-positiver und negativer Promotoren voneinander trennen, was auf verschiedene Repressionsmechanismen hindeutet (Oster et al., 2000; Oster et al., 2003).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Um zu verstehen, wie Myc in der Tumorigenese wirkt sind Kenntnisse über Interaktionspartner und Wirkmechanismen von Myc sehr wichtig. Myc ist ein Transkriptionsfaktor, der Gene aktivieren oder reprimieren kann, wobei verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. Insbesondere die Repression von Zielgenen war und ist mechanistisch wenig verstanden. Zu Beginn dieser Arbeit gab es erste Studien, die zeigten, dass Myc-Box II-abhängige Kofaktoren zu aktivierten Zielgenen rekrutiert werden. In der vorliegenden Arbeit sollten durch ChIP-Analysen in einem Myc-induzierbaren Zellsystem die Interaktionen zwischen Myc und seinen Kofaktoren untersucht und in Bezug zu transkriptionellen Regulationsmechanismen von Myc gesetzt werden. Im Verlauf der hier vorgestellten Untersuchungen ergaben sich darüber hinaus erste Hinweise auf eine Interaktion von Myc mit dem generellen Kofaktor Mediator. In einer detaillierten *in vitro*- und *in-vivo*-Interaktionsstudie sollte untersucht werden, ob und über welche Untereinheit(en) der Komplex mit Myc interagiert. Ziel war es, über eine möglichst kleine Mutation im Myc-Protein die Interaktion mit dem Mediator-Komplex zu stören und damit die Bedeutung dieser Interaktion für die Funktion von Myc zu untersuchen.

2 Material

2.1 Stämme und Zelllinien

2.1.1 Bakterienstämme

DH5 α *E.coli* F ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYAaegF)U169 deoR recA1 endA1
 hsdR17 (r_K^i, m_K^+)phoA supE44 λ -thi-1 gyr A96 relA1

BL-21(DE3) *E.coli* B F $^-$ dcm ompT hsdS(r_B-m_B -)gal λ (DE3)

2.1.2 Säugerzellen

HeLa humane Zervix-Karzinom-Zelllinie (ATCC)

HeLa-EcoR HeLa-Zellen mit stabil exprimiertem ecotrophen Rezeptor

U2OS humane Osteosarkomzelllinie (ATCC)

U2OS-MycER Humane Osteosarcoma-Zelllinie mit 4-OHT-regulierbarem Myc-ER (Puro)

Phoenix^{ECO} Humane Packaging Zelllinie für rekombinante, ecotrophe Retroviren (Grignani et al., 1998).

P493-6 Humane B-Zelllinie mit exogenem, Tetrazyklin-regulierbarem Myc (Pajic et al., 2000; Schuhmacher et al., 2001).

2.2 Medien

2.2.1 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium (Miller) 10g bacto-Trypton (BD)
5g Bacto-Hefeextrakt
10g NaCl
ad 1000ml H₂O, pH 7,0
autoklavieren, im kühlraum lagern

LB-Agar LB Medium (Miller)
1,5% (w/v) Bacto-Agar

SOB-Medium 20g Trypton
5g Hefeextrakt
10mM NaCl
2,5mM KCl
10mM MgCl₂
10mM MgSO₄

SOC-Medium SOB-Medium
1% 2M Glucose

2.2.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Medien für die Zellkultur wurden von der Firma BioWhittaker (Verviers, Belgien) geliefert. Fetales Kalbserum (FCS) sowie Kalbserum (CSB) wurde von der Firma Sigma bezogen.

Vollmedium für adherente Säugerzellen (HeLa, U2OS)

500ml DMEM (Dulbeccos modified Eagles Medium), mit Phenolrot, 50ml fetales Rinderserum (FBS, wärmeinaktiviert, 30min bei 56°C), mit 5ml Penicillin (10.000 U/ml)/ Streptomycin (10mg/ml)

Vollmedium für Suspensions- Zellen (P493-6)

500ml RPMI-1640 mit 10% FBS und Penicillin (10.000U/ml)/Streptomycin (10mg/ml)

Vollmedium für Säugerzellen (Phoenix^{ECO})

500ml DMEM („Dulbecco's modified Eagle's Medium“) mit 10% Serum Supreme (BioWhittaker, wärmeinaktiviert bei 56°C, 30 min), 5ml Penicillin (10.000U/ml)/Streptomycin (10mg/ml), 4,5g/L Glucose, Phenolrot und L-Glutamin)

Einfriermedium	Vollmedium s.o. 10% FCS 10% DMSO
Trypsin/EDTA	1x Trypsin/EDTA 89% kaltes 1x TBS 10% 10x Trypsin 1% 0,5M steriles EDTA
PBS pH 7,4	130mM NaCl 3mM KCl 6,4mM Na ₂ HPO ₄ 1,5mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 mit HCl einstellen

4-OHT 4-Hydroxytamoxifen (Sigma) ,Stammlösung 1 mM in Ethanol, Endkonzentration für Induktion: 200 nM

Tetrazyklin (Tet) Stammlösung 0,1mg/ml; Endkonzentration für Induktion: 100ng/ml

2.2.3 Selektionsantibiotika:

Puromycin (InvivoGen) Stammlösung: 10mg/ml
Endkonzentration: 5µg/ml

G418 (Neomycinderivat), Stammlösung: 200mg/ml
(Calbiochem) Endkonzentration: 700µg/ml

Hygromycin B Stammlösung: 410mg/ml, 457,000U/ml
(Calbiochem) Endkonzentration: 200µg/ml

Plastikwaren, Kulturschalen und -flaschen sowie andere Einwegartikel für die Zellkultur wurden entweder über die Firmen Greiner oder Nunc bezogen.

2.3 Synthetische Oligonukleotide

DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma MWG, Ebersberg oder Metabion, Martinsried synthetisiert und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in H₂O aufgenommen und auf 100µM eingestellt. RNA-Oligonukleotide für shRNA-Experimente wurden bei Metabion, Martinsried bestellt und auf 100µM eingestellt.

2.3.1 Primer für die RT-PCR

<i>c/EBPα</i>	5'-Primer: 5'- aagcacgatcagtccatccag-3` 3'-Primer: 5'- gggcacagaggccagataca-3`
<i>p57</i>	5'-Primer: 5'-cggcgatcaagaagctgtc-3` 3'-Primer: 5`-ccgacgacttctcaggcg-3`
<i>NCL</i>	5'-Primer: 5'-agcaatcaggctggagttgc-3` 3'-Primer: 5`-cagtgggtatcctcagacaggcc-3`
<i>CycD2</i>	5'-Primer: 5'-acaaccctgacagcatcacg-3` 3'-Primer: 5`-gagaggccctagaggtgctagact-3`
<i>MED24</i>	5'-Primer: 5'-cattgctggacatcatggac-3` 3'-Primer: 5'-agcgagcagccagtga-3`
<i>S14</i>	5'-Primer: 5'- -3` 3'-Primer: 5'- -3`
<i>β2-MICROGLOBULIN</i>	5'-Primer: 5'-tctcgctccgtggcct-3' 3'-Primer: 5'-tcagtaagtcaacttcaatgtcggat-3'
<i>GTF3C4</i>	5'-Primer: 5'-ttgctccatgacagcattg-3` 3'-Primer: 5`-ggggctttgcagtaacctct-3`
<i>SCD</i>	5'-Primer: 5'-cctagaagctgagaaactgggtga-3` 3'-Primer: 5`-acatcatcagcaagccaggt-3`
<i>MTHFD1</i>	5'-Primer: 5'-cgagaaggatgtggatggat-3` 3'-Primer: 5`-gaatgaaacagtcattgaggtcac-3`
<i>IRF7</i>	5'-Primer: 5'-gcacgtccacctcccattac-3` 3'-Primer: 5'-gctgcagtgagccgagatg-3`

2.3.2 Primer zur Amplifikation genomischer Loci

<i>NCL</i> E-Box	5'-Primer: 5'- agtctttcgccctcagtctcga-3' 3'-Primer: 5'- tcaaggccggttaccttcg-3'
<i>MTHFD2</i> E-Box	5'-Primer: 5'- tcttactcccaaagtttacctctc-3' 3'-Primer: 5'- gttaagggcaggcacgatg-3'
<i>Cyclin D2</i> E-Box	5'-Primer: 5'- aaacgccaccagatcgatatctc-3' 3'-Primer: 5'- gcatgcttgagtcaaggctgt-3'
rDNA	5'-Primer: 5'- ggcggtttgagtgagacgaga-3' 3'-Primer: 5'- acgtgcgctcaccgagagcag-3'
<i>c/EBPα</i> Promotor	5'-Primer: 5'- tacctctgcgcggaaacac-3' 3'-Primer: 5'- gcgtctcctagctctgatctcc-3'
<i>p21CIP1</i> Promotor	5'-Primer: 5'- cgagcgcggtgcctccttgag-3' 3'-Primer: 5'- cggcccgggtcccctgtgtct-3'
<i>STAT1</i> Promotor	5'-Primer: 5'- atctgtcctctgcctggattctc-3' 3'-Primer: 5'- gcagcccagtcctgtgt-3'
<i>IFNβ</i> Promotor	5'-Primer: 5'- gcctgccttctgagttctccatccc-3' 3'-Primer: 5'- ggagaaactgccacaagtggaaatcacac-3'
Kontrollregion (<i>NCL</i> , transkribierte Region)	5'-Primer: 5'- agcaatcaggctggagttgc-3' 3'-Primer: 5'- cagtggatcctcagacaggcc-3'

2.3.3 Primer für die Klonierung

Klonierung von *c-MYC* cDNA in pGex3T4

5'-EcoR1-cMyc(2) 5'-cccgaattcgcccctcaacgtagcttc-3'
3'-XhoI-cMyc (163) 5'-gggctcgagtcagttcgggctgccgctgtct-3'

Klonierung von *c-MYC* cDNA (1-294) mit C-terminalen Kernlokalisationssignal (NLS)

Hind3-Myc 5'primer 5'-cccaagcttcaccatgccctcaacgtagctt -3'
Xba1-NLS-Myc 3'primer: 5'-gggtctagactacaccttcttcttcttgggtggg

tgaggaggtttgct-3´

2.3.4 Oligonukleotide zur Klonierung in pSUPER-Vektoren

5` Scramble:

5`gatcccccataagctgagatacttcattcaagagatgaagtatctcagctgttttggaaa-3´

3` Scramble:

5´agcttttccaaaacataagctgagatacttcattcattgaatgaagtatctcagcttatgggg-3´

5` Med24:

5`gatccccagacaccgcgaagacatttcaagagaaatgtcttcgcgggtgtctcttttggaaa-3´

3` Med24:

5´-agcttttccaaaagagacaccgcgaagacatttctcttgaaaatgtcttcgcgggtgtccggg-3´

2.4 Plasmide

2.4.1 Grundvektoren

pcDNA3 Eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV (Cytomegalievirus)
Promotor und T7 Promotor (Invitrogen)

pcDNA3.1 (-) Eukaryotischer Expressionsvektor mit reverser Orientierung der
„multiple cloning site“ (Invitrogen)

pBABE Vektoren für die Herstellung rekombinanter Retroviren im BOSC
/Phoenix System mit zusätzlichen Resistenzgenen gegen
Puromycin, Hygromycin oder Phleomycin (Morgenstern und
Land, 1990)

pSUPER (OligoEngine) Vektor für die Expression von „small hairpin
RNA“ (shRNA) in Säugerzellen mit
Polymerase-III H1-RNA und T7 Promotor;

basierend auf dem pBlueScript-KS Vektor
(Brummelkamp et al., 2002)

pRetrosuper (OligoEngine) retroviraler Vektor zur Herstellung
rekombinanter Viren zur stabilen Integration
von shRNA in Säugerzellen

2.4.2 Expressionsplasmide

Expressionsvektoren mit cDNA von Mediator-Untereinheiten (wurden von J. Conaway zur Verfügung gestellt). Diese sind als Flag-Fusionen in pcDNA3.1 /Hygro(+) einkloniert und sind über den CMV-Promotor in Säugerzellen bzw. den T7-Promotor *in vitro* zu exprimieren.

pcDNA3.1-Flag-Med1	Humane Med1/Trap220 cDNA
pcDNA3.1-Flag-Med4	Humane Med4/Trap36 cDNA
pcDNA3.1-Flag-Med7	Humane Med7 cDNA
pcDNA3.1-Flag-Med8	Humane Med8 cDNA
pcDNA3.1-Flag-Med9	Murine Med25 cDNA
pcDNA3.1-Flag-Med10	Murine Med10/Nut2 cDNA
pcDNA3.1-Flag-Med11	Murine Med11/HSPC296 cDNA
pcDNA3.1-Flag-Med14	Humane Med14/CRSP150/RGR1 cDNA
pcDNA3.1-Flag-Med15	Humane Med15/Arc105 cDNA
pcDNA3.1-Flag-Med17	Humane Med17/Trap80 cDNA
pcDNA3.1-Flag-Med18	Humane Med18/p28b cDNA
pcDNA3.1-Flag-Med19	Murine Med19/Rox3/LCMR1 cDNA

pcDNA3.1-Flag-Med20	Murine Med20/TRFP cDNA
pcDNA3.1-Flag-Med21	Humane Med21/Srb7 cDNA
pcDNA3.1-Flag-Med22	Humane Med22/Surf5 cDNA
pcDNA3.1-Flag-Med23	Humane Med23/Sur2 cDNA
pcDNA3.1-Flag-Med24	Humane Med24/Trap100 cDNA
pcDNA3.1-Flag-Med27	Humane Med27/Crsp34 cDNA
pcDNA3.1-Flag-Med29	Humane Med29/Intersex cDNA
pcDNA3.1-Flag-Med30	Murine Med30/Trap25 cDNA
pcDNA3.1-Flag-Med31	Murine Med31/Soh1 cDNA
pcDNA3.1-Flag-AK007855	Humane AK007855 cDNA
pcDNA3-MycCMV-	Vektor mit humaner c-Myc cDNA. Die cDNA stammt aus pBluescript KS-Myc
CMV-Myc Δ N1	CMV-Vektor mit humaner c-Myc cDNA, welche für die Aminosäuren 158-493 codiert.
CMV-Myc Δ N2	CMV-Vektor mit humaner c-Myc cDNA, welche für die Aminosäuren 225-493 codiert.
CMV-Myc Δ N3	CMV-Vektor mit humaner c-Myc cDNA, welche für die Aminosäuren 269-493 codiert.
CMV-Myc Δ C1	CMV-Vektor mit humaner c-Myc cDNA, welche für die Aminosäuren 1-367 codiert.
CMV-MycvC2	CMV-Vektor mit humaner c-Myc cDNA, welche für die Aminosäuren 1-294 codiert.

CMV-Myc Δ C3	CMV-Vektor mit humaner c-Myc cDNA, welche für die Aminosäuren 1-221 codiert.
CMV-Myc Δ D	CMV-Vektor mit humaner c-Myc cDNA mit einer internen Deletion im Bereich Aminosäure 190-252.
CMV-Myc Δ PEST	CMV-Vektor mit humaner c-Myc cDNA mit einer internen Deletion im Bereich Aminosäure 206-269.
pcDNA3-Miz-1	pcDNA3 Vektor mit humaner Miz-1 cDNA. Die cDNA stammt aus pUHD-Miz-1
PCS2+-TIP48	von Dr. Wedlich zur Verfügung gestellt
PCS2+-TIP49	von Dr. Wedlich zur Verfügung gestellt
pcDNA3-eGFP	pcDNA3-Vektor mit kodierender Sequenz für eGFP
CMV- β -Gal	Vektor für die Expression von β -Galaktosidase in eukaryotischen Zellen (freundlicherweise von Dr. Stefan Gaubatz zur Verfügung gestellt)

2.4.3 Expressionsplasmide für prokaryotische Expression

pGex4T3	prokaryotischer Expressionsvektor für die Expression von rekombinanten Proteinen mit GST-Tag in E.coli BL-21
pRSetA	prokaryotischer Expressionsvektor für die Expression von rekombinanten Proteinen mit Hit-Tag in E.coli BL-21 (Invitrogen)

2.4.4 Reporterplasmide

pTK+AP2/E	Artifizieller E-Box-Reporter
-----------	------------------------------

2.5 Lösungen und Puffer

2.5.1 Lösungen für die Zellkultur

Trypsin/EDTA	Invitrogen, 1x Trypsin/EDTA Lösung;gebrauchsfertig
DMSO	Merck, Dimethylsulfoxid (100%)
Hygromycin B	Calbiochem, Stocklösung 397mg/ml
Puromycin	Sigma, Stocklösung 20mg/ml
Trypanblau	0,5% (w/v) in PBS
4-Hydroxytamoxifen	Sigma, Stammlösung 1 mM in Ethanol,Endkonzentration für Induktion: 200 nM
Polybrene (Hexadimethrinbromid)	Sigma (Stammlösung 4mg/ml)
PBS pH 7.4	130 mM NaCl 3mM KCl 6,4mm Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM NaH ₂ PO ₄ ad pH 7.4 mit HCl justiert
2x HBS	280mM NaCl 1,5mM Na ₂ HPO ₄ 50mM Hepes-KOH pH 7,05

2.5.2 Lösungen für Reporterassays

β-Gal Substratlösung	6mg/ml ONPG in H ₂ O
Luziferase- Substratmix	0,2mM D-Luziferin (Applichem), 25mM Gly-Gly pH 7,8
β -Gal-Reaktionspuffer	60mM Na ₂ HPO ₄ , pH 8,0 1mM MgSO ₄ 10mM KCl 50mM 2-Mercaptoethanol

2.5.3 Lösungen für Immunfluoreszenz

Fixierungslösung	Paraformaldehyd 3,7% (w/v) in PBS pH 7,4 (frisch angesetzt)
Blocklösung	5% (v/v) FCS / 0,1% (v/v) NP-40 in PBS
Waschlösung	0,1% NP-40 in PBS
Hoechst33342	Endkonzentration 10µg/ml

2.5.4 Lösungen für Proteinextraktion und -konzentrationsbestimmung

Protease Inhibitoren, Sigma	80µM Aprotinin 2mM Leupeptin 4mM Bestatin 1,5mM Pepstatin A 1,4mM E-64 in DMSO, Lagerung bei -20°C Der Cocktail wird 1:1000 eingesetzt.
-----------------------------	---

Bradford Reagenz 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250
 4,75% (v/v) Ethanol
 10% (v/v) Ortho-Phosphorsäure
 in H₂O; filtrieren, lichtgeschützt lagern

BSA Fraktion V (AppliChem)

IPH-Puffer 50mM Tris pH8
 150mM NaCl
 5mM EDTA
 0,5% NP40

NP40-Lysepuffer 150mM NaCl
 50mM Tris pH8, 0
 NP-40 1% (v/v)

2.5.5 Lösungen für SDS-PAGE, Westernblot und Immunpräzipitation

3x SDS Puffer 4,8ml 4x Trenngelpuffer
 0,6g SDS (6% SDS)
 0,43g DTT (0,3M Dithiothreitol)
 kleine Spatelspitze Bromphenolblau
 3,5ml Glycerin
 ad 10ml in H₂O

Laufpuffer	25mM Tris/HCl pH 8,3 0,2M Glycin 0,1% (w/v) SDS
Acrylamidstammlösung	30% (w/v) Acrylamid (Applichem) 0,8% (w/v) N,N'-Methylen-bisacrylamid in H ₂ O Lagerung: 4° C, lichtgeschützt
Blotpuffer	10-20% (v/v) Methanol 150mM Glycin 20mM Tris-Base
Blocklösung	5% (w/v) Magermilchpulver (Merck) in TBS-T
Protein G-Sepharose	Sigma (Suspension in 20% (v/v) Ethanol / H ₂ O)

2.5.6 Lösungen für die Silberfärbung

Fixierlösung (200ml)	100ml Ethanol 24ml Essigsäure 100µl Formaldehyd (frisch zugesetzt) 75,9ml H ₂ O
Pretreat-Lösung	0,2g/L Na ₂ S ₂ O ₃
Silbernitratlösung (200ml)	0,4g AgNO ₃ 0,15ml Formaldehyd (frisch zugesetzt)

Entwicklungslösung (200ml)	12g Na ₂ CO ₃
	100µl Formaldehyd (frisch zugesetzt)
	4ml Pretreat-Lösung

Stopplösung	50% Ethanol
	12% Essigsäure
	0,5% (w/v) Glycin

2.5.7 Lösungen für RNA-Extraktion

DEPC-H ₂ O	0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat in H ₂ O
	12h 37°C, DNA autoklavieren
Trizol	Invitrogen

2.5.8 Lösungen für PCR, RT-PCR und qPCR

Desoxynukleosid-Triphosphate, Sigma (100mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Oligo (dT)₁₅, Roche (1µg/µl)

2.5.9 Lösungen für DNA-Extraktion und Agarose-Gelelektrophorese

Ethidiumbromid	Roth (Stammlösung 10mg/ml in H ₂ O)
6x DNA-Probenpuffer	40% (w/v) Saccharose
	0,2% (w/v) Bromphenolblau
	0,2% (w/v) Xylenxyanol
	10mM EDTA pH 8, 0

TAE-Puffer	40mM Tris-Acetat 1mM EDTA pH 8, 0
TE-Puffer	10mM Tris/HCl 1mM EDTA pH 8,0
TES-Puffer	10mM Tris-HCl pH 7,5 1mM EDTA 200mM NaCl
STE-Lösung	150mM NaCl 10 mM Tris /HCl pH 8,0 1mM EDTA pH 8, 0

2.5.10 Lösungen für Chromatinimmunpräzipitation

LYSIS-Puffer I	5mM Pipes pH8 85mm KCL 0,5% NP40
LYSIS-Puffer II (RIPA)	10mM Tris-HCl pH 7.5 150mM NaCl 1% NP40 0,1% SDS 1mM EDTA 1% DOC

Waschpuffer I	20mM Tris pH 8,1 150mM NaCl 2mM EDTA 0,1% SDS 1% TX100
Waschpuffer II	20mM Tris pH 8,1 500 mM NaCl 2 mM EDTA 0, 1% SDS 1% TX100
Waschpuffer III	0,25M LiCl 1% NP40 1% Na-Deoxycholat 1mM EDTA 10 mM Tris pH 8,1
Elutionspuffer	1%SDS 0,1M NaHCO ₃
Lachssperma-DNA	400µg/ml, sonifiziert
BSA (in Ripa-Puffer)	20mg/ml

2.5.11 Lösungen für Kernextraktion

Puffer A	10mM HEPES-KOH pH 7,9
	10mM KCl
	1,5mM MgCl ₂
	0,5mM DTT
	0,5% NP40

Puffer B	20mM HEPES-KOH pH 7,9
	400mM NaCl
	1,5mM MgCl ₂
	0,5mM DTT
	0,2mM EDTA
	15% Glycerin

2.5.12 Lösungen für IVT-GST-Pulldown

Z-Puffer	25mM HEPES pH7,5
	150mM NaCl
	12,5mM MgCl ₂
	20% Glycerin
	0,1% NP40

NETN-Puffer	20mM Tris pH8
	100mM NaCl
	1mM EDTA
	0,5% NP40

20x SSC	3M NaCl 0,3M Na-Citrat pH 7,0
STET-Puffer	8% (w/v) Saccharose 0,5% (v/v) Triton X-100 50mM EDTA 50mM Tris-HCl pH 8,0
TBE-Puffer (0,5x)	45mM Tris-Borat 2mM EDTA pH 8, 0
20x TBS	1M Tris/HCl pH 7,4 3M NaCl
TBS-T	1x TBS / 0,2% (v/v) Tween-20

2.5.13 Lösungen für Oligonukleotid-Pulldown

Puffer A	100mM KCl 10mM HEPES-KOH pH7,9 10% Glycerin 1mM DTT (frisch zugeben) 5mM MgCl ₂ 0,1% NP40 10mM NaF 20mM Bisphosphoglycerat Protease-Inhibitoren (1:1000, frisch zugeben)
----------	---

2.5.14 Lösungen für Ni-NTA-Aufreinigung von His-Tag Proteinen

Puffer A 6M Guanidin/HCl
 0,1M NaH₂PO₄
 pH8

Puffer B1 5M Harnstoff
 0,1M NaH₂PO₄
 pH8

Puffer B2 1M Harnstoff
 0, NaH₂PO₄
 pH8

Puffer C 100mM KCl
 0,1M NaH₂PO₄
 1mM MgCl₂
 pH7

2.5.15 Lösungen für die Aufreinigung von GST- Proteinen

STE-Puffer 10mM Tris pH 8
 150mM NaCl
 1mM EDTA

2.6 Chemikalien

Soweit nicht besonders aufgeführt, wurden Chemikalien in Analysenqualität oder in Qualität für die Molekularbiologie von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt) und Applichem (Heidelberg) bezogen. Feinchemikalien mit höchstem Reinheitsgrad wurden entweder von Sigma (Deisenhofen) oder Gibco-Life Technologies (Karlsruhe) verwendet.

Amersham Pharmacia	Poly (dI) Poly (dC) L-[35S]-Methionin
Calbiochem	NP-40
Difco	Agar, Bactopeptone, Bactotrypton
Fluka	ATP
GibcoBRL	TEMED
Invitrogen	Agarose
Riedel de Haen	Ethanol, Isopropanol, Methanol, NaCl, Formaldehyd 37%
Roth	Tris , Phenol, Phenol / Chloroform, Tween-20, Glycerin, Glycin

2.7 Standards und Enzyme

2.7.1 Standards

Molekulargewichtsmarker	Full Range Rainbowmarker RPN 800 (Amersham) Low Range Rainbowmarker RPN 755 (Amersham)
DNA-Marker	1Kb DNA Ladder 1µg/µl (GibcoBRL)

2.7.2 DNA modifizierende Enzyme

Restriktionsendonukleasen	Amersham, Freiburg Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Alkalische Phosphatase (shrimps)	Boehringer, Mannheim (1U/μl)
Proteinase K	Stammlösung 10mg/ml
T4-DNA-Ligase	Amersham, Freiburg (5U/μl)
RNAse-freie DNAse	Promega (1 U/μl)
RNAseA	(Boehringer) Stammlösung 10mg/ml
Pfu-Turbo Polymerase	Stratagene (2,5U/μl)
RedTaq-Polymerase	Sigma (1U/μl)
Hot Gold Star	Eurogentec (5U/μl)
Reverse Transkriptase (M-MLV)	(Invitrogen)
T7 RNA Polymerase	TNT Quick Coupled Transkription/ Translation System (Promega)

2.8 Filme, Filter und Membrane

Filme	ECL Hyperfilm (Amersham) BIOMAX MR Scientific Imaging Film (Kodak)
Blotting-Membran für Proteine	Immobilon-P, PVDF Transfer Membran (Millipore)
Blotting-Membran für RNA	Zetaprobe GT Nylonmembran (Biorad)
Whatman-Filterpapiere	Gel-Blotting Papier (Schleicher und Schuell)
Dialyse-Membran	Spectra/Por (Spectrum)

2.9 Geräte

AbiPrism, 7000 Sequence Detection System, Biosystems

Begasungsbrutschränke, Heraeus BBD 6220

Biofuge, Heraeus Fresco

Durchflusszytometer: FACSCalibur, Becton-Dickinson

Luminometer, Lumat LB 9507, Berthold

Mikroskop DMIRB, Leica

Mini-Transilluminator, Biorad

Megafuge 1.OR, Heraeus

PCR-Maschine: Primus Thermocycler, MWG

Photometer: Ultrospec 3000 UV/visible Spectrophotometer, Pharmacia

NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer

Primus Thermocycler, MWG

Sterilarbeitsbank, Heraeus HeraSafe

Schüttelinkubatoren Model G25, New Brunswick Scientific Co. Inc

Semidry-Blotapparatur: Transblot SD Apparatur, Biorad

Sonifizierungsgerät: Branson Sonifier W-250D

Tischzentrifugen: Biofuge, Heraeus Fresco

Transblot SD Apparatur, Biorad

Ultrospec 2000, Pharmacia

UV-Handlampe, 6 Watt Lampe, UVP

UV-StratalinkerTM-UV-Crosslinker-2400, Stratagene

Zentrifugen: Megafuge 1.OR, Heraeus

Zellhomogenisator Typ Art-Miccra D8

2.10 Antikörper

2.10.1 Primäre Antikörper

anti-Flag	monoklonaler Mausantikörper M2 (Sigma) für Western-Blot und Immunpräzipitation
anti-p21	polyklonaler Kaninchenantikörper AB-5 (Calbiochem) für Western-Blot
anti-Cdk2	polyklonaler Kaninchenantikörper M2 (St. Cruz) für Westernblot
anti-Bcl2 (sc-783)	polyklonaler Kaninchenantikörper (St. Cruz)
anti-Miz-1 (10E2)	monoklonale Mausantikörper (Hybridomaüberstände, J. Bartek)
anti-Miz-1 (NE2)	polyklonaler Kaninchenantikörper
anti-Myc (9E10)	monoklonaler Mausantikörper (Evan et al., 1985) für Westernblot
anti-Myc N-262	polyklonaler Kaninchenantikörper (St. Cruz) für Immunpräzipitation (Epitop N-Terminal)
anti-Myc C40	polyklonaler Kaninchenantikörper (Andreas Trumpp) für Immunpräzipitation und Westernblot (Epitop C-Terminal)

anti-Trrap	polyklonaler Antikörper aus Kaninchen
anti-Tip60	polyklonaler Antikörper aus Kaninchen (B. Amati)
anti-Tip48/Tip49	polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, der nicht zwischen den beiden Proteinen diskriminiert (A. Dutta)
anti-TIP48 (L12E)	polyklonaler Antikörper aus Kaninchen (von Huber zur Verfügung gestellt)
anti-TIP49 (E12TC)	polyklonaler Antikörper aus Kaninchen (von Dr. Huber zur Verfügung gestellt)
anti-Cdk8 (C-19)	polyklonaler Antikörper aus Ziege (Santa Cruz)
anti-RNAPII (8WG16)	CTD-spezifischer, monoklonaler Mausantikörper, Abcam Ltd.
anti-RNAPII P-Ser2 (H-5)	
anti-RNAPII P-Ser5 (H-14)	
anti-Acetyl-Histone H4	Upstate (06-866)
anti-Acetyl-Histone H3	Upstate
anti Histon H2B	Upstate
anti-p300 (N15) sc-584	polyklonaler Kaninchenantikörper
anti-Med11	polyklonaler Kaninchenantikörper (J. Conaway)

2.10.2 Sekundäre Antikörper

anti-Kaninchen-Rhodamin Affinitätsgereinigter Antikörper (Jackson Immuno Research), Ziege anti Kaninchen Immunglobulin

anti-Kaninchen-HRP	Affinitätsgereinigter Antikörper (Amersham) Esel anti-Kaninchen Immunglobulin
anti-Maus-HRP	Affinitätsgereinigter Antikörper (Amersham) Esel anti-Maus Immunglobulin
anti-Maus-FITC	Affinitätsgereinigter Antikörper (Dianova) Ziege anti-Maus Immunglobulin
anti-Kaninchen-HRP	Affinitätsgereinigter Antikörper (Amersham) Esel anti-Kaninchen Immunglobulin
anti-Maus-HRP	Affinitätsgereinigter Antikörper (Amersham) Esel anti-Maus Immunglobulin

2.11 Kit-Systeme

DNA-Aufreinigungskit	Nucleotrap Kit (Machery-Nagel) PCR Purification Kit (Qiagen)
DNA-Isolationskit	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)
Entwicklerlösungen für Westernblot	ECL Western blotting Detektions-Reagenzien 1 und 2 (Amersham) ECL Plus Western Blotting Detektions-Reagenzien (Amersham)
<i>in vitro</i> Translationskit	TNT Quick Coupled Transkription/Translation System (Promega)
Oligonukleotidaufreinigung	Qiaquick Nukleotide removal kit (Qiagen)
qPCR Kit	qPCR Core Kit for SYBR Green I (Eurogentec)

Plasmid Maxi Kit	JETstar 2.0 Plasmid Purification Maxi Kit (Genomed)
RNA-Isolationskit	Qiagen RNAeasy (Qiagen)
Transfektionskit	Lipofektamine™ 2000 (Invitrogen)

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Plasmidpräparation im analytischen Maßstab, photometrische Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA Lösungen, Transformation von kompetenten Bakterien, Ligationen, Polymerasekettenreaktionen (PCR), Verdau mit Restriktionsendonukleasen, sowie Agarosegelelektrophorese im analytischen und präparativen Maßstab und Extraktion von DNA aus dem Gel wurden in Anlehnung an in Standardwerken veröffentlichten Protokollen durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Sequenzbestimmungen von doppelsträngiger DNA wurden von der Firma SeqLab, Göttingen durchgeführt.

3.1.2 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Standardmäßig wurde der Sicherheitsstamm DH5 α eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte in LB-Medium mit oder ohne 1 μ g/ml Ampicillin bei 37°C in Schüttelinkubatoren. Kurzfristige Lagerungen von Klonen erfolgte auf LB Agar-Platten (mit Ampicillin). Zur dauerhaften Lagerung wurden 1ml einer Übernachtskultur mit 0,5ml Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

3.1.3 Transformation chemokompetenter Bakterien

100 μ l auf Eis aufgetaute, chemokompetente Bakterien wurden mit dem zur Transformation vorgesehenen Plasmiden (0,1 - 1 μ g DNA) bzw. mit dem Ligationsansatz (10 μ l) vorsichtig gemischt und für 30min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42°C (Wasserbad) für 90sec. Nach 1min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien in 750ml LB-Medium ohne Ampicillin für 45min in einem Schüttelinkubator bei 700 Upm, 37°C inkubiert und anschließend entweder auf LBamp-Agarplatten in geeigneter Konzentration ausgestrichen und ü.N. in einem Brutschrank bei

37°C inkubiert oder in eine Flüssigkultur aus LB-Medium mit 1µg/ml Ampicillin überführt und in einem Schüttelinkubator bei 250 Upm, 37°C ü.N. inkubiert.

3.1.4 Plasmidamplifikation und Isolation aus Bakterien

Um größere Mengen eines Plasmides zu erhalten, wurden 400ml einer E. coli-Übernachtskultur (400ml LBamp-Medium gemäß den Angaben des Herstellers für den DNA-Maxipräp-Kit (JETstar 2.0 Plasmid Purifikation Maxi Kitt, Genomed) verarbeitet. Die Plasmidpräparationen wurde in TE-Puffer gelöst und in einer Konzentration von 1µg/µl bei -20°C gelagert.

3.1.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Für die Analyse von Nukleinsäuremolekülen (DNA und RNA) wurde die Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 1-2% (w/v) gewählt. Die jeweilige Menge Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht, auf ca. 50°C abgekühlt, mit 0,3µg/µl Ethidiumbromid versetzt und in einen geeigneten Gelträger mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen 6x DNA-Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 110V für 30min - 2h. Die DNA-Fragmente wurden durch Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid bei dessen Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 254nm sichtbar gemacht. Gesamt-RNA wurde zur Kontrolle der Qualität ebenfalls in der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierzu wurde die RNA-Probe mit 0,5Vol 3xSDS-Puffer versetzt und analog zu der DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Bei RNA-Proben wurden jedoch spezielle Gelträger, Probenkämme und Laufkammern verwendet, um eine Kontamination der Materialien mit RNase auszuschließen.

3.1.6 Aufreinigung von DNA

3.1.6.1 Aufreinigung von DNA aus Lösungen

Die Isolation von DNA aus Lösungen erfolgte unter Verwendung des PCR Purification Kits (Qiagen) gemäß der Herstellervorschrift. Die DNA wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß mit mindestens 20µl Puffer EB-Puffer (10mM Tris-HCl, pH 8.5) eluiert. Die Aufreinigung der DNA aus Chromatinimmunpräzipitationsexperimenten wurde mit 100µl EB-Puffer eluiert, jeweils 2µl wurden pro 25µl qPCR-Ansatz verwendet.

3.1.6.2 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen wurden die gewünschten DNA-Banden unter langwelligem UV-Licht mit einem Einmal-Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick-Gelextraktionskit (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers extrahiert. Die DNA wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß mit mindestens 20µl Puffer EB-Puffer (10mM Tris-HCl, pH 8.5) eluiert.

3.1.7 Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA (Restriktionsverdau)

Die sequenzspezifische, enzymatische Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den vom jeweiligen Hersteller vorgegebenen Puffer- und Inkubationsbedingungen.

Reaktionsansatz:

- x µg DNA
- 1/10 Vol. 10x Restriktionspuffer
- x µl Restriktionsendonuklease(n)
- (ggf. 1µl RNaseA)
- x µl H₂O
- Endvolumen 20-100µl

Das Volumen des eingesetzten Enzyms überschritt in keinem Fall 1/10 des Gesamtvolumens des Reaktionsansatzes, um die Reaktion durch das in der Enzymlösung enthaltene Glycerin nicht zu beeinträchtigen.

Bei einem analytischen Restriktionsverdau von Plasmid-Minipräparationen wurde zusätzlich 1µl RNaseA zugeben.

Die Reaktion erfolgte bei den nach Herstellerangaben empfohlenen Temperaturen (in der Regel bei 37°C) für 2h.

3.1.8 Ligation

Zur kovalenten Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde das Enzym T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) eingesetzt. Die Reaktion wurde gemäß der vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Inkubationsbedingungen durchgeführt. 100-200ng des linearisierten Plasmids (Vektor) wurden zusammen mit dem in bis zu 10fachem molaren Überschuss vorliegenden DNA-Fragment (Insert) in Gegenwart von 1µl T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 10µl für 15-20h bei 16°C inkubiert.

Ligationsansatz:	100-200ng linearisiertes Plasmid
	x ng Insert
	1µl 10x Ligasepuffer
	1µl Ligase
	ad 10µl H ₂ O

3.1.9 Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion

3.1.9.1 Quantitative PCR (qPCR, Realtime PCR)

Bei der qPCR wird der fluoreszierende Farbstoff SYBRGreen I (Eurogentec) in die sich vermehrende doppelsträngige DNA inkorporiert und nach jedem Zyklus optisch vermessen. Die Fluoreszenzzunahme entspricht der Zunahme an doppelsträngiger DNA. Durch die zeitechte Detektion des

Fluoreszenzsignals ist es möglich, jede einzelne PCR-Reaktion in ihrer exponentiellen Phase zu quantifizieren. In der exponentiellen Phase vermehrt sich die DNA-Menge in jedem Zyklus um den gleichen Faktor, der annähernd 2 beträgt.

Es wurde das Core Kit für SYBRGreen (Eurogentec) mit folgendem Ansatz verwendet:

PCR-Ansatz: 2 µl template
 1 µl Primer-Mix (jeweils 100 nM)
 1 µl dNTPs (5 mM)
 0,75 µl MgCl₂ (50 mM)
 2,5 µl 10 X Puffer
 0,75 µl SYBRGreen I
 0,125 µl DNA Hot Gold Star Polymerase

Die PCR-Reaktionen wurden im AbiPrism, 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt.

3.1.9.2 Nicht-quantitative PCR

Für nicht-quantitative PCR-Reaktionen wurde folgender Ansatz verwendet:

PCR-Ansatz: 1 µl Template
 4 µl Primer-Mix (jeweils 100 nM)
 1 µl dNTPs (10 mM)
 5 µl 10 X Puffer
 1 µl DNA Polymerase

Für analytische PCR-Reaktionen wurde die DNA-Polymerase Redtaq (Sigma (1U/µl) verwendet, bei präparativen PCR-Reaktionen für Klonierungen die Pfu-Turbo-Polymerase (Stratagene, 2,5U/µl).

3.1.10 cDNA Synthese

2 µg RNA in einer Konzentration von 0,2µg/µl wurden für 1min bei 65°C in einem PCR-Reaktionsgefäß in einer PCR-Maschine denaturiert und die RNA für 1min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 40 µl des cDNA-Mastermixes (siehe unten) zugegeben und für 50min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C und 5min gestoppt und die erhaltene cDNA (gesamter Reaktionsansatz) bei 4°C gelagert.

cDNA-Mastermix für eine Reaktion	10 µl 5 X Puffer
	5 µl dNTPs (10 mM)
	5 µl DTT (0.1 M)
	0, 2 µl RNAsin
	2 µl Random-Primer p (dN)6 (Roche)
	1 µl rev. Transkriptase
	16, 8 µl H ₂ O

3.1.11 Photometrische Messung von DNA-und RNA-Konzentrationen

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration einer wässrigen Lösung wurde deren Absorption bei 260nm in einer Quarzküvette (Schichtdicke 1cm) bestimmt. Eine Absorptionseinheit entspricht hier 50µg/ml DNA. Durch Messung bei 280nm und der Bestimmung des Quotienten A₂₆₀/A₂₈₀ kann die Reinheit einer DNA-Präparation abgeschätzt werden. Eine ausreichend reine Präparation sollte einen Quotienten A₂₆₀/A₂₈₀ von 1,8 ± 0,2 aufweisen.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte ebenfalls bei einer Absorption von 260nm. Eine Absorptionseinheit entspricht hier 40µg/ml RNA.

Zur Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA wurde außerdem das NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer verwendet. Für dieses Gerät benötigt man keine Messküvetten, zur Konzentrationsbestimmung werden lediglich 1-2µl der wässrigen DNA- oder RNA-Lösung auf einen Messpunkt pipettiert. Durch das Herunterklappen eines Messarms entsteht eine Flüssigkeitssäule über dem Messpunkt, durch die die Messung zwischen den Enden zweier optischer Fasern durchgeführt wird.

3.1.12 Isolation von Gesamt-RNA aus Säugerzellkulturen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen wurde das Trizol-Reagenz (Invitrogen) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

Die Zellen (als trockenes Pellet oder direkt auf der trockenen Kulturschale) wurden mit 1 ml Trizol-Reagenz aufgeschlossen, ggf. abgeschabt und in einem 1,5ml Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur 3min inkubiert. Anschließend wurden zur Phasentrennung 200 µl Chloroform zugesetzt, 10sec gevortext und bei 14000 Upm 10min in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, in der sich die RNA befand, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol wurde die RNA gefällt und bei 4°C in der Tischzentrifuge bei 14000 Upm pelletiert. Das RNA-Pellet wurde einmal mit 75%igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in 40 µl RNase-freiem Wasser (Qiagen) resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Photometer (NanoDrop) bei einer Absorption von 260nm. Kurzfristige Lagerungen der RNA erfolgte als wässrige Lösung bei -80°C, für längerfristige Lagerungen wurde die RNA durch Zugabe von 1/10 Vol 3M NaAc und 2,5 Vol Ethanol präzipitiert und bei -80°C gelagert.

3.1.13 Microarray

Jeweils 2 µg RNA aus den unter 3.3.7.2 beschriebenen Zellen wurden für ein Microarray-Experiment verwendet. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden von der Microarray-Serviceeinheit des IMT, Marburg durchgeführt. Die RNA wurde zunächst preamplifiziert (aRNA), was neben einer Vervielfachung der mRNA einen Aufreinigungseffekt erzielen sollte. Die aRNA wurde unter Verwendung von Nonanukleotiden mit Zufallssequenz (*Random Primer*) in cDNA umgeschrieben und die cDNA indirekt mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 markiert, wobei jede cDNA (shMed24 und shScr) einmal mit Cy3 und einmal mit Cy5 markiert wurde („Flip-colour“-Markierung). Die fluoreszenzmarkierten cDNA-Proben (Sonden) wurden aufgereinigt (CyScribe Post-Labeling Kit, Amersham Biosciences) und über Nacht jeweils zwischen zwei cDNA-Microarray Chips (mit 11552 einzelsträngigen, humanen cDNA-Klonen) im Sandwich-Verfahren hybridisiert (von der Microarray-Gruppe des IMT durchgeführt). Die Daten wurden von Birgit Samans ausgewertet.

3.2 Proteinbiochemische und immunbiologische Methoden

3.2.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten wurde die von Bradford (Bradford, 1976) beschriebene Methode verwendet. Mit Hilfe einer BSA-Referenzkurve wurde der Proteingehalt der Zelllysate bestimmt. Dazu wurden in Einmal-Plastikküvetten 100µl einer 150mM NaCl-Lösung vorgelegt und 1µl, 2µl, 4µl, 6µl, 8µl und 10µl einer Lösung von BSA (1mg/ml) zugegeben. In der gleichen Weise wurden 2µl des Zelllysates eingesetzt. Anschließend wurde in jede Küvette 1ml Bradford-Reagenz gegeben und sofort in einem Photometer die Extinktion bei 595nm gegen einen Leerwert ohne Protein bestimmt. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde dann an der erstellten BSA-Referenzkurve abgelesen.

3.2.2 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen durch diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese erfolgte nach Laemmli (Laemmli, 1970) unter denaturierenden Bedingungen. Vor dem Beladen der Gele wurden die Proben mit 3x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5min bei 95°C denaturiert. Die Proteine wurden anschließend im Westernblot analysiert oder durch eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

3.2.3 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Nachdem die Proteine in einer diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, wurde das Gel mindestens 20min in Färbelösung (50% Methanol; 7% Essigsäure; 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250) unter leichten Schütteln inkubiert und anschließend für 30min bis mehrere Stunden in Entfärber (50% Methanol; 10% Essigsäure) entfärbt.

3.2.4 Silber-Färbung von Polyacrylamidgelen

Das Gel wurde mindestens für 1h in einer Glasschale mit Fixierlösung fixiert und anschließend 3x 20sec mit 50% Ethanol gewaschen. Es folgte eine 1-minütige Inkubation des Gels in Pretreat-Lösung und anschließend 3x20min in Wasser. Die Färbung erfolgte für 20min in Silbernitrat-Lösung. Nach 3x20sec Waschen in Wasser erfolgte die Entwicklung für 10-30min. Das Gel wurde erneut 2x1min in Wasser gewaschen und die Reaktion schließlich durch Inkubation in Stopp-Lösung abgebrochen.

3.2.5 Westernblot

Die Proteine wurden im semi-dry Verfahren aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Millipore) übertragen. Die Membran wurde für 1min in 100%

Methanol, kurz in Wasser und schließlich für mindestens 5min in Transferpuffer inkubiert, um die Benetzung sicherzustellen. Der Transfer erfolgte in einer Transblot SD Apparatur (Biorad) nach Vorschrift des Herstellers bei 22 V und maximal 4 mA/cm² für 25-35min. Dem Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin) wurde 10% (v/v) Methanol für Proteine > 100 kDa, 15% Methanol für Proteine zwischen 50 kDa und 100 kDa und 20% Methanol für Proteine < 50 kDa zugesetzt.

Nach dem Transfer wurde die Membran in Blocklösung (5% Magermilchpulver (w/v) in TBS-T) für 2h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte in einer für den Antikörper angemessenen Verdünnung in Blocklösung 2-4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Die Membran wurde dreimal 10min mit TBS-T gewaschen und für eine Stunde in mit dem sekundären, an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper in Blocklösung (1:4000) inkubiert. Nach viermal 10min Waschen mit TBS-T wurden die spezifischen Banden durch das ECL- bzw. bei schwächeren Signalen mit dem ECL+ Westernblotting Detection System (Amersham) nach Anweisung des Herstellers auf Hyperfilm (Amersham) detektiert.

3.2.6 Koimmunpräzipitation

1. Herstellung von Proteinlysaten durch Sonifizierung

Die Zellen wurden mit in 1ml IPH-Puffer resuspendiert und durch Sonifizierung mit einer Mikrospritze (4X10sec 20% Amplitudenstärke) und anschließender 30min Inkubation bei 4°C im Überkopfschüttler extrahiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (10min 14000Upm) in der Tischzentrifuge abgetrennt und die Proteinkonzentration mit der Bradford-Methode (siehe 3.2.1) bestimmt.

2. Immunpräzipitation

100-150µg Protein wurden pro Ansatz eingesetzt und mit IPH-Puffer (+Protease-Inhibitoren) auf ein gleiches Volumen eingestellt, welches mindestens 300µl betrug. Anschließend wurde zu den Ansätzen 2µg Antikörper gegeben und über Nacht im Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden Protein-G-Sepharose (Beads) in IPH-Puffer äquilibriert. Jeweils 25µl der Beads wurden zu den Lysaten gegeben und für 1 bis 2h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Die Beads wurden viermal mit je 1ml IPH-Puffer gewaschen, anschließend erfolgte die Elution durch Zugabe von 40µl 2XSDS-Puffer und 5-minütiger Inkubation bei 95°C. 10µl des Überstandes wurde in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot analysiert.

3.2.7 Chromatinimmunpräzipitation

Chromatinimmunpräzipitationen dienen dem Nachweis von Interaktionen bestimmter Proteine an spezifischen genomischen Loci.

Präparation des Chromatins

Pro Ansatz wurde eine 15 cm Zellkulturplatte mit 80-90% konfluenten HeLa-Zellen bzw. 2×10^7 P493-6-Zellen eingesetzt. Formaldehyd wurde zur Fixierung der Zellen in einer Finalkonzentration von 1% in das Zellkulturmedium gegeben (10min bei 37°C im Wärmeschrank). Die Zellen wurden ggf. in 1,5 ml PBS (mit Protease-Inhibitoren) von der Zellkulturplatte abgeschabt und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen (alle weiteren Puffer wurden ebenfalls eisgekühlt). Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in 0,5ml LYSIS Puffer I pro Ip-Ansatz (mit Protease-Inhibitoren) aufgenommen, auf Eis für 20min inkubiert und erneut pelletiert. Die Zellen wurden daraufhin in pro Ip-Ansatz 0,5ml LYSIS Puffer II (RIPA) resuspendiert und 10min auf Eis inkubiert. Danach wurde jeweils 1ml des Zelllysates in einem 15 ml Falcon mit einem Branson W-250D Sonifier 8 x 10 sec bei 10% Power (mit 30sec Pause nach jeder Sonifizierung) im Kühlraum sonifiziert. Die resultierenden DNA-Fragmentgrößen wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

betrugen i.d.R. zwischen 200 und 1000bp. Das Lysat wurde dann für 10min bei 14000 Upm in einer Mikro-Kühlzentrifuge bei 4°C von den unlöslichen Bestandteilen geklärt. Das Chromatin im Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zu diesem Zeitpunkt konnte das Chromatin zur Langzeitlagerung bei –80°C eingefroren werden oder direkt weiter verwendet werden.

Blockierung der Sepharose-Beads

In einem 15 ml Falcon wurde ein Aliquot einer 50%igen Protein A/G-Sepharose-Mischung (Beads, 50µl pro Immunpräzipitation) zweimal mit RIPA-Puffer gewaschen, in 5ml RIPA-Puffer aufgenommen und mit 1mg/ml BSA, 400µg/ml sonifizierter Lachssperma-DNA und Protease-Inhibitoren (1:1000) versetzt. Dieses Gemisch wurde über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Beads einmal mit RIPA-Puffer gewaschen.

Depletion unspezifisch-bindender Chromatin-Komponenten (*Preclearing*)

Das eingefrorene Chromatin wurde auf Eis aufgetaut. Das Volumen wurde auf mindestens 300µl pro Ip-Ansatz mit RIPA-Puffer eingestellt. 50% des blockierten Protein A/G-Sepharose-Gemischs wurde daraufhin zum verdünnten Chromatin gegeben und 3-6 Stunden auf einem Überkopfschüttler im Kühlraum inkubiert. Die Beads wurden anschließend abzentrifugiert und verworfen.

Immunpräzipitation

Das geklärte Chromatin wurde abzentrifugiert und der Überstand für die Immunpräzipitation (Ip) auf 1,5 ml Eppendorfgefäße verteilt. Ein Anteil (1/30) des für eine Ip eingesetzten Chromatins wurde als Input separiert. Daraufhin wurden 2µg Antikörper zur Präzipitation bestimmter Protein-DNA-Komplexe zu den einzelnen Ansätzen hinzugegeben. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden zu jeder

Immunpräzipitation 60µl des blockierten Sepharose-Gemischs hinzugegeben und für 1-2h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert.

Waschschritte:

Die Sepharose-Beads wurden in einer Mikrokühlzentrifuge bei 3000 Upm für 1min zentrifugiert. Die Pellets wurden mit je 1ml Waschpuffer I (zweimal), Waschpuffer II (dreimal) und Waschpuffer III (viermal) gewaschen (bei Waschpuffer III mit je 5min Inkubation bei 4°C auf einem Überkopfschüttler). Abschließend wurde einmal mit TE pH8 gewaschen. Alle Waschpuffer wurden vorgekühlt und mit Protease-Inhibitoren (1:1000) versetzt.

Aufhebung des Crosslinkings und Aufreinigung der präzipitierten DNA:

Die Beads wurden in 250µl Elutionspuffer aufgenommen. Das Gemisch wurde kurz gevortext und für 15min bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurden die Beads für 1min bei 3000 Upm in einer Mikrozentrifuge bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde in einem anderen Eppendorfgefäß aufgehoben. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt und die Eluate vereinigt. Der Input wurde mit RIPA-Puffer auf das gleiche Volumen gebracht (ca. 500µl) und parallel mit den Eluat aufgereinigt.

Zu den Proben wurde ein Proteinase K / RNase A-Puffer hinzugegeben (20µl 5M NaCl; 10µl 500mM EDTA; 20µl 1M Tris pH6, 5; 2µl 10mg/ml Proteinase K; 1µl 10mg/ml RNase A), zum Input nur Proteinase K und RNase in derselben Konzentration. Das Gemisch wurde schließlich 3h bei 55°C und über Nacht bei 65°C inkubiert.

Die immunpräzipitierte DNA wurde mit einem Qiaquick-PCR-Aufreinigungskit (Qiagen) aufgereinigt und in 100µl EB-Puffer eluiert. Für die anschließende PCR wurden 2µl Eluat eingesetzt.

3.2.8 Immunfluoreszenz

Die adherenten Zellen wurden auf sterilen Deckgläsern ausgesät und bei einer Konfluenz von 30-50% mit 3,7% Paraformaldehyd (Fixierpuffer) für 15min in der Kulturschale bei RT fixiert. Zur Inaktivierung des PFA wurden die Zellen 2x mit PBS+0,1M Glycin gewaschen und anschließend 2x für 10min bei RT mit PBS+0,1% NP40 permeabilisiert. Anschließend wurden die mit den Zellen behafteten Deckgläschen auf Parafilm in einer dunklen Feuchtekammer überführt. Die folgenden Lösungen wurden in einem Vol. von 50µl als Tropfen auf die Deckgläschen aufgebracht und bei Raumtemperatur inkubiert.

- Blockierung für 45min mit PBS+0,1% NP40+5%FBS
- Antikörperbindung (1.Antikörper verdünnt in Blockierlösung 1:50) 45min
- 3x Waschen mit Blockierlösung jeweils 5min
- Sekundärantikörper (Rhodamin-gekoppelter anti-IgG in Blockierlösung) 45min
- Kernfärbung mit Hoechst (10µg/ml) 5min
- 3x Waschen mit PBS+0,1% NP40

Die Deckgläschen wurden anschließend einmal mit H₂O abgespült und im Mobiol eingebettet auf einen Objektträger aufgebracht.

3.2.9 Expression rekombinanter Proteine in Bakterien

Zur Expression von rekombinanten Proteinen in Bakterien wurde der E.coli Stamm BL-21 zusammen mit Expressionsplasmiden verwendet, deren offener Leserahmen unter der Kontrolle eines IPTG (Isopropylthiogalactosid) induzierbaren Promotors steht (pGex). pGEX4T3 kodiert Glutathion S-Transferasen (GST), welches eine Aufreinigung mit Glutathion-Sepharose ermöglicht. BL21 Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid transformiert

und als Über-Nacht-Vorkultur in 50ml LB-Medium + Ampicillin angezogen. Am nächsten Morgen wurden 500ml LB-Medium + Ampicillin (Hauptkultur) mit 50ml der Vorkultur angeimpft und ca. eine Stunde weiter kultiviert. Die Absorption der Kultur bei 600nm (OD600) wurde regelmäßig in Einmal-Küvetten gemessen, bei einer OD von 0,4 bis 0,6 wurde die Kultur mit IPTG (1 μ M) induziert und für 4h kultiviert. Als Kontrolle wurden vor der Induktion 10ml Kultur entnommen und ohne IPTG parallel kultiviert. Zur Expressionskontrolle wurde jeweils 1ml der induzierten und nicht-induzierten Kultur in 1,5ml Reaktionsgefäßen in einer Heraeus-Tischzentrifuge pelletiert, in 100 μ l 2xSDS-Puffer aufgenommen und durch Inkubation bei 95°C für 5min lysiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation bei 14000Upm für 1min in der Tischzentrifuge von unlöslichen Bestandteilen getrennt. 5 μ l des geklärten Lysats wurde über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, welches im Anschluss mit Coomassie-Lösung gefärbt wurde. Die induzierte Hauptkultur wurde ebenfalls durch Zentrifugation bei 4000Upm für 10min geerntet. Das trockene Zellpelett wurde entweder direkt lysiert oder bei -20°C gelagert.

3.2.10 Affinitätschromatografische Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Wie in 3.2.9 beschrieben wurden die Fusionsproteine in BL21-Zellen exprimiert. Die Bakterien wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 4000 Upm bei 4°C geerntet und in 2ml STE-Puffer (+5mM DTT und Protease-Inhibitoren) resuspendiert. Zu der Suspension wurde N-Laurylsarkosin (Sarkosyl) bis zu einer Endkonzentration von 1,5% zugegeben, und gevortext. Die Zellen wurden zweimal für 10sec auf 50% der maximalen Energie sonifiziert. Nachdem das Lysat durch Zentrifugation (5000 Upm, 15min bei 4°C) von unlöslichen Bestandteilen getrennt wurde, wurde Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 2% zugegeben. Anschließend wurden 300 μ l Glutathion-Beads zugegeben und für mindestens 2h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Die Beads wurden viermal mit PBS +1% Triton X-100 (+Protease-Inhibitoren) und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Für die Elution der Fusionsproteine wurden die Beads in 3ml Elutionspuffer

(50mM Tris pH8; 25mM Glutathion, reduziert) für 30min bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Um das Glutathion aus dem Eluat zu entfernen wurde der Überstand in einen Dialyseschlauch überführt und ü.N bei 4°C gegen 2L PBS +10% Glycerin dialysiert. Die Konzentration des Fusionsproteins wurde durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung im Vergleich zu einer Standardmenge BSA abgeschätzt. Die Lösung wurde bei -20°C (in 1-10µg-Einheiten aliquotiert) gelagert.

3.2.11 Isolation von Zellkernproteinen (Kernextraktion)

Die adherenten Zellen wurden auf der Zellkulturschale einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 1ml PBS abgeschabt. In einem 15ml Reaktionsgefäß (Falcon) wurden die Zellen bei 1500 Upm für 5min abzentrifugiert und in 1ml Puffer A (+Protease-Inhibitoren) resuspendiert. Nach 15min Inkubation auf Eis wurde die Suspension für 15sec gevortext und anschließend bei 4000 Upm und 4°C für 3min zentrifugiert. Das Zellkern-Pellet wurde in 180µl Puffer B (+Protease-Inhibitoren) resuspendiert und für 20min bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Die lysierten Kerne wurden durch Zentrifugation bei 14000 Upm und 4°C von unlöslichen Bestandteilen getrennt, der Überstand (Kernextrakt) wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.12 GST-Pulldown aus Kernextrakt

Pro GST-Pulldown-Reaktion wurde 1mg Kernextrakt eingesetzt. Die Kernextrakte (siehe 3.2.11) liegen in einem Hochsalzpuffer (Puffer B) vor und mussten zunächst mit einem Verdünnungspuffer (Puffer B ohne NaCl) von 400mM auf 100mM verdünnt werden. Anschließend wurde der Kernextrakt durch Zugabe von 30µl Glutathion-Beads und 30min Inkubation bei 4°C im Überkopfschüttler geklärt.

Parallel wurden die Fusionsproteine bzw. das GST an Glutathion-Beads gekoppelt. Pro Pulldown-Reaktion wurden 20µg des rekombinanten Proteins

in 1ml Verdünnungspuffer (+Protease-Inhibitoren) und 20µl Beads für 1h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Nicht gebundenes Protein wurde durch einmaliges Waschen mit Verdünnungspuffer entfernt. Die gekoppelten Beads wurden anschließend über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler mit dem geklärten Kernextrakt inkubiert. Die Beads wurden anschließend viermal mit HENG-Puffer gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine von den Beads erfolgte durch Zugabe von 30µl 2xSDS-Puffer und 5min Inkubation bei 95°C.

3.2.13 Oligonukleotid-Pulldown von DNA-bindenden Proteinen

Das verwendete, biotinylierte Promotorfragment des *P21CIP1*-Gens wurde bereits in früheren Studien als Binderegion sowohl für Miz-1 als auch für Myc nachgewiesen (Wu et al., 2003). HeLa-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für Miz-1, Myc, Tip48 und Tip49 in den angezeigten Kombinationen transfiziert und die Lysate wurden zusammen mit dem 5'-biotinylierten Promotorfragment in ein Oligopulldown-Experiment eingesetzt. Die einzelstängigen, komplementären Oligonukleotide wurden zunächst in TES-Puffer 2min bei 100°C inkubiert und dann durch langsames Abkühlen hybridisiert. Nach einer Ethanol-fällung wurde die DNA in TE-Puffer +50mM NaCl auf eine Konzentration von 1µg/ml eingestellt. Pro Ansatz wurden 1-2 15cm-Zellkulturschalen HeLa-Zellen in kaltem PBS abgeschabt und pelletiert. Die Zellen wurden in 1 ml Puffer A lysiert und 4 mal 10sec sonifiziert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation (15min 13000Upm) geklärt. Streptavidin-Sepharose (Orian et al.) wurde in Puffer A äquilibriert und das Lysat 1h bei 4°C im Überkopfschüttler mit 50µg Streptavidin-Sepharose inkubiert (*Preclearing*). Die Beads wurden verworfen und ein Aliquot des Überstandes wurde mit 3xSDS-Puffer versetzt und als Input-Probe bei 4°C gelagert. Jeweils 1ml des Lysates wurden mit 1µg der biotinylierten Oligonukleotide und 10µg Poly(dI)/Poly(dC) (Amersham) als unspezifischer Kompetitor über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden 20µl der äquilibrierten Streptavidin-Sepharose zugegeben und 1h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Die Beads wurden 3 x mit 1 ml Puffer A

gewaschen. Die Elution erfolgte mit 80µl 2xSDS-Puffer bei 95°C. Die Proben wurden direkt in einer SDS-PAGE analysiert.

3.2.14 *in vitro* Translation

Pro Ansatz wurden 0,4µg Plasmid-DNA, 0,5µl ³⁵S-Methionin und der T7-RNA-Polymerase-enthaltende Reaktionsmastermix aus dem TNT Quick Coupled Transkription/Translation System (Promega) in einem Gesamtvolumen von 25µl gemischt und 60min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde 1µl des Ansatzes mit 10µl 2X SDS-Puffer versetzt und auf einem 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde unter Vakuum getrocknet, die ³⁵S-markierten Translationsprodukte wurden im Autoradiogramm (BIOMAX MR Scientific Imaging Film, Kodak) nachgewiesen. Anhand dieses Autoradiogrammes wurden die Mengen an Translationsprodukten abgeschätzt und entsprechende Volumina für den GST-Pulldown (3.2.15) verwendet.

3.2.15 GST-Pulldown *in vitro* translatierter Proteine

Pro GST-Pulldown-Ansatz wurden 20µg GST bzw. Fusionsprotein an 20µl Glutathion-Sepharose gekoppelt. Hierzu wurden die Beads zweimal mit Z-Puffer gewaschen und mit dem Fusionsprotein für mindestens 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Kopplung wurden die Beads einmal mit Z-Puffer gewaschen. Zu den 20µl Beads wurden 200µl Z-Puffer, 1µl DTT (200mM) und 6µl BSA (5mg/ml) gegeben und 10min bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden 2-5µl des ³⁵S-markierten Translationsproduktes (Volumen hängt von der Menge an Translationsprodukt im Ansatz ab, siehe 3.2.14) zugegeben und 1h bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler inkubiert. Die Beads wurden anschließend viermal mit 1ml NETN-Puffer gewaschen und in 40µl 2x SDS-Puffer bei 95°C für 5min inkubiert. Der Überstand wurde auf ein SDS-PA-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde in einem Vakuumtrockner getrocknet und auf einem Biomax-Film (Kodak) exponiert.

3.3 Zellbiologischen Methoden

3.3.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Arbeiten mit Säugerzellkulturen wurden im Wesentlichen nach Standardmethoden, wie sie z.B. bei Spector (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998) beschrieben sind, durchgeführt.

Für adherente Zellen wie HeLa, U2OS und Phoenix^{ECO}-Helferzellen wurden Polystyrol-Zellkulturschalen in den Durchmessers 6cm, 10cm oder 15cm verwendet (Nunc, Greiner) Die Zellen wurden in Vollmedium (siehe Material) in Heraeus BBD 6220 Begasungsbrutschränken bei 37°C, 96% relativer Feuchte und 5% CO₂ kultiviert. Die Mediumvolumina betrugen 5ml/6cm-Schale, 10ml/10cm-Schale bzw. 20ml/15cm-Schale. Suspensionszellen wie P493-6 wurden in unbeschichteten Zellkulturflaschen in RPMI-Vollmedium kultiviert.

3.3.2 Passagieren von Zellkulturen

In Abhängigkeit ihrer Wachstumsrate und Dichte wurden adherente Zellen alle 2-3 Tage zwischen 1:5 und 1:20 verdünnt und neu ausplattiert (passagiert). Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 0.5-2ml Trypsin-EDTA für 3-5min im Brutschrank bei 37°C von der Kulturschale abgelöst. Die Zellsuspension wurde dann in der gewünschten Zelldichte auf eine neue Kulturschale ausgesät. Suspensionszellen wurden in einer Zelldichte zwischen 2×10^5 und 1×10^7 Zellen/ml) kultiviert und in der Kulturflasche mit frischem Medium verdünnt.

3.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Frisch trypsinisierte und in einem definierten Volumen Medium resuspendierte Zellen wurden auf die Zählkammer unter das Deckglas pipettiert. Anschließend wurde die Zellzahl viermal in den 16 Großquadraten gezählt. Durch

Multiplikation des Mittelwertes mit dem Faktor 10000 erhält man die Angabe der Zellzahl pro ml. Da sich in Suspensionskulturen immer auch ein Teil toter Zellen befindet, wurde hierbei zuvor eine Trypanblau-Färbung der Zellen durchgeführt. Hierzu wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit der Trypanblau-Lösung gemischt. Der Farbstoff reichert sich in toten Zellen an und färbt diese blau. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden nur die lebenden Zellen gezählt.

3.3.4 Einfrieren und Auftauen von Säugerzellkulturen

Für die Langzeitlagerung eukaryotischer Zellen wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Um die Bildung von schädlichen Eiskristallen beim Einfriervorgang zu vermeiden, wurden die Zellen in speziellem Einfriermedium langsam auf die Lagertemperatur gebracht. Die Zellen wurden abzentrifugiert und das Zellpellet wurde in DMEM-Medium mit 20% FCS und 10% DMSO aufgenommen (ca. 5×10^6 Zellen/ml). Die erhaltene Zellsuspension wurde in Nunc Kryogefäßen (2 ml) abgefüllt und für 45min in -20°C , danach über Nacht bei -80°C und schließlich in flüssigen Stickstoff gelagert.

In Stickstoff tiefgekühlte Zellen wurden direkt von -172°C in ein auf 37°C erwärmtes Wasserbad überführt und dort aufgetaut, bis die Zellsuspension gerade flüssig wurde. Die Zellsuspension (1ml) wurde sofort mit 10 ml Vollmedium gemischt und danach für 5min in einer Heraeus Minifuge RF bei 1000 Upm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Vollmedium resuspendiert und in die üblichen Zellkulturgefäße (Schalen oder Flaschen) überführt.

3.3.5 Regulation der *MYC*-Expression in P493-6 Zellen (Myc TET-OFF)

Die Zelllinie P493-6 (Pajic et al., 2000) wurde in Abwesenheit von Tetrazyklin in einer Zelldichte von 2×10^5 bis 1×10^7 Zellen/ml als Suspensionskultur bei 37°C und 5% CO_2 Partialdruck in RPMI 1640-Medium kultiviert. Unter diesen Bedingungen wird das exogene Myc exprimiert. Durch Zugabe von

Tetrazyklin (Tet, 0,1 µg/ml Endkonzentration) erfolgt die Reprimierung des exogenen Myc. Nach 3-tägiger Kultivierung der Zellen in Tet-haltigem Medium arretieren die Zellen der Go/G1-Phase des Zellzyklus (Pajic et al. 2000), unter diesen Bedingungen wird kein endogenes Myc mehr exprimiert (-Myc-Bedingung). Anschließend wurde ein Teil der Zellen durch Depletion des Tetrazyklin restimuliert (+Myc-Bedingung). Hierzu wurden die Zellen dreimal in Serum-haltigem PBS gewaschen und in tetrazyklin-freiem Medium kultiviert.

3.3.6 Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellkulturen

3.3.6.1 Transiente Transfektion mit der Calcium-Phosphat-Methode

Transiente Transfektionen wurden in der Regel mit der Calcium-Phosphat-Methode durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bildung eines DNA-Calciumphosphat-Präzipitates, das sich auf der Oberfläche der Zellen ablagert und von diesen endozytotisch aufgenommen wird.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen so ausplattiert, dass am nächsten Tag eine Konfluenz von 40-50% zu erwarten war: HeLa-Zellen: $2 \cdot 4 \times 10^5$ Zellen/6cm-Platte bzw. $4 \cdot 8 \times 10^5$ Zellen/10cm-Platten.

Phoenix--Zellen wurden wesentlich dichter ausplattiert, da eine Virusproduktion (siehe 3.3.7.1) in konfluenten Kulturen begünstigt ist: 5×10^5 Zellen/6cm-Schale, 2×10^6 /10cm-Schale und 8×10^5 bis 2×10^6 /15cm Schale.

4h vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt.

Die Reaktionsansätze wurden in 15ml-Reaktionsgefäßen vorgelegt. In 15ml-Reaktionsgefäßen wurden pro Ansatz 1,5ml (15cm Schale), 1ml (10cm-Platte) bzw. 500µl (6cm-Platte) 2xHBS-Puffers vorgelegt.

	6cm-Platte	10cm-Platte	15cm-Platte
DNA	10-15µg	30-40µg	40-60 µg
CaCl ₂ (2,5 M)	50µl	100µl	150µl
H ₂ O	ad 500µl	ad 1ml	ad 1,5ml

Dazu wurde tropfenweise die DNA-CaCl₂-Lösung gegeben, wobei das Reaktionsgefäß mit dem 2xHBS stark gevortext wurde. Das gebildete Präzipitat wurde resuspendiert und zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden über Nacht mit dem Präzipitat inkubiert, nach 12-15h einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versehen.

3.3.6.2 Stabile Transfektion von Säugerzellen

Die stabile Transfektion wird analog zur transienten Transfektion, jedoch mit anschließender Selektion auf den im transfizierten Plasmid enthaltenen Selektionsmarker durchgeführt.

3.3.7 Retrovirale Infektionen zur Integration von Plasmid-DNA

3.3.7.1 Herstellung rekombinanter Retroviren

Der retrovirale Gentransfer (Pear et al., 1993) ermöglicht die stabile Integration von Plasmid-DNA in das Genom von Säugerzellen. pRetrosuper (OligoEngine), in den die entsprechenden shRNA-kodierenden DNA-Oligonukleotide kloniert wurden, diente als Vektor. Die Konstrukte wurden durch transiente Transfektion in die Phoenix-Packaging-Zellen transfiziert. Phoenix-Zellen sind HEK293, die die Gene gag (Proteine der inneren Kapsel; Mo-MuLV), pol (Polymerase-, Integrasefunktion; Mo-MuLV) und VSV-G (Hüllprotein von VSV) stabil exprimieren und nach der Transfektion rekombinante Viren in das Medium abgeben. Für die Transfektion der

Phoenix-Packaging-Zelllinie wurden $5\text{-}6 \times 10^6$ Zellen auf eine 15cm Kulturschale plattiert und am nächsten Tag (24h später) 60µg DNA mit der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Am nächsten Morgen (12-14h nach Transfektionsbeginn) wurden die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen und mit 7ml frischem Medium versetzt. Nach 24h wurde der Virusüberstand abgenommen und für 5min in einer Heraeus-Megafuge bei 1200 Upm und 4°C abzentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen (1.Ernte). Der Überstand wurde in 7ml-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Infektion bei -80°C gelagert. Die Phoenix-Zellen wurden erneut mit 7ml Medium gefüttert und der Überstand nach weiteren 24h geerntet (2.Ernte) und eingefroren.

3.3.7.2 Infektionen von Zellen mit rekombinanten Retroviren

Einen Tag vor der Infektion wurden 5×10^5 HeLa-Zellen auf eine 10cm Kulturschale ausplattiert. Zur Infektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 3-6ml viralem Überstand (shMed24, shScr) versetzt. Es wurden 2ml Medium auf 3ml Virusüberstand sowie 4µg/ml Polybrene (Hexadimethrinbromid, Sigma) zur Erhöhung der Infektionseffizienz hinzu gegeben. Es folgte ein Inkubationsschritt bei 37°C im Brutschrank für 12-16h. Danach wurden 5ml Medium zugegeben. Schließlich wurden die Zellen 48h nach Infektionsbeginn mit Puromycin (Endkonzentration: 5µg/ml) selektiert. Mittels Zellen, denen das jeweilige Resistenzgen fehlte, wurde die Vollständigkeit der Selektion überprüft. Das Selektionsmedium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt.

3.3.8 Bestimmung der Luziferaseaktivität

Die Zellen wurden 36-48h nach Transfektion mit kaltem PBS / 1mM DTT gewaschen, in 1ml PBS/1mM DTT abgeschabt und durch Zentrifugation für 3min bei 4000rpm und 4°C in einer Heraeus-Minifuge pelletiert. Die Zellen wurden in 200µl Kpi-Lysepuffer/1mM DTT (+Protease-Inhibitoren 1:1000)

aufgenommen und durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C aufgeschlossen. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 13.000rpm für 10min bei 4°C wurde das Lysat von den unlöslichen Bestandteilen getrennt. Zur Messung der Aktivität der transfizierten Luziferase-Reporterkonstrukte wurde die Luziferase-Aktivität im Zelllysate bestimmt. Das Enzym Luziferase aus *Photinus pyralis* katalysiert unter Verbrauch von ATP die Oxidation des Substrates Luziferin unter Emission von Licht. Die Messung erfolgte in einem Gerät mit automatischer Injektion des Substrates (Luminometer). In ein Reaktionsröhrchen wurden 350µl ATP-Reaktionspuffer vorgelegt und direkt vor der Messung wurden 50µl des Überstandes zugegeben. Die Luziferin-Lösung (0,2mM D-Luziferin, 25mM Gly-Gly pH7,8) wurde an den Ansaugschlauch des Luminometers (Lumat LB 9507, Berthold) angebracht. Die Menge des emittierten Lichts wurde während einer Zeitspanne von 20sec nach automatischer Injektion gemessen. Die Messwerte sind Mittelwerte aus unabhängigen Triplikaten.

3.3.9 Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde das CMV- β -Gal-Expressionsplasmid kotransfiziert. In den Lysaten wurde dann die β -Galactosidaseaktivität gemessen und zur Normierung der Luziferase-Messwerte (siehe 3.3.8) benutzt. 50µl des Zelllysates wurden zu 750µl Reaktionspuffer (β -Galactosidase-Puffer) in eine Halbmikro-Einmalküvette gegeben. Nach Zugabe von 100µl ONPG-Substratlösung und Mischen wurden die Küvetten bei 37°C für 1-24h inkubiert, bis eine deutlich sichtbare Gelbfärbung auftrat. Die Konzentrationsmessung des entstandenen Produkts und damit die Aktivitätsbestimmung der β -Galactosidase erfolgte durch Messung der Absorption bei 420nm.

4 Ergebnisse

4.1 Kofaktoren und Transkriptionsmechanismen von c-Myc

In früheren Studien zu Myc-abhängigen Transkriptionsmechanismen wurde eine Vielzahl von Myc-Kofaktoren beschrieben, von denen jedoch nur wenige tatsächlich *in vivo* an genomischen Myc-Bindestellen nachgewiesen wurden. Es handelte sich ausschließlich um Bindestellen aktivierter Zielgene (Bouchard et al., 2001; Frank et al., 2001). Kofaktoren und Mechanismen der Myc-vermittelten Repression sind nach wie vor weitgehend unbekannt. Um die Mechanismen der transkriptionellen Regulation durch Myc besser zu verstehen, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, welche Myc-Kofaktoren für die transkriptionelle Aktivierung bzw. Repression durch Myc notwendig sind. Hierzu wurde zunächst geklärt, ob bekannte Myc-Kofaktoren *in vivo* selektiv entweder zu den Bindestellen aktivierter oder reprimierter Zielgene rekrutiert werden.

4.1.1 Tetrazyklin-abhängige Regulation der Myc-Expression in P493-6-Zellen

Als System zur Untersuchung Myc-abhängiger Transkriptionsmechanismen wurden die Zelllinie P493-6, eine humane B-Zelllinie gewählt, bei der die Expression eines exogenen, humanes *c-MYC*-Allels unter der Kontrolle eines Tetrazyklin (Tet)-regulierten Promotors steht (Pajic et al., 2000). Die Expression dieses exogenen *MYC*-Allels wird durch Zugabe von 0,1 µg/ml Tetrazyklin unterdrückt (Tet-OFF-System, (Gossen and Bujard, 1992). Um auch das endogene Myc zu unterdrücken, wurden die Zellen für drei Tage mit Tet behandelt. Unter diesen Bedingungen arretieren die Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklusses und es wird weder endogenes noch exogenes *MYC* exprimiert (Pajic et al., 2000). Tatsächlich konnte unter diesen Bedingungen nahezu kein *MYC* im Westernblot nachgewiesen werden (Abb.4a, 0h Tet-Entzug). Der Entzug des Tetrazyklins führte zu einer raschen Induktion des exogenen *MYC*-Allels.

Abbildung 4b zeigt die Expression von Myc, des Myc-reprimierten Zielgens p21 (*P21CIP1*) sowie dem nicht-regulierten Haushaltsgen (*CDK2*) in einem Zeitverlauf nach Zugabe von Tet. Man erkennt eine deutliche Reduktion der Myc-Expression schon 2 bis 3h nach Zugabe von Tet sowie die Aktivierung von p21.

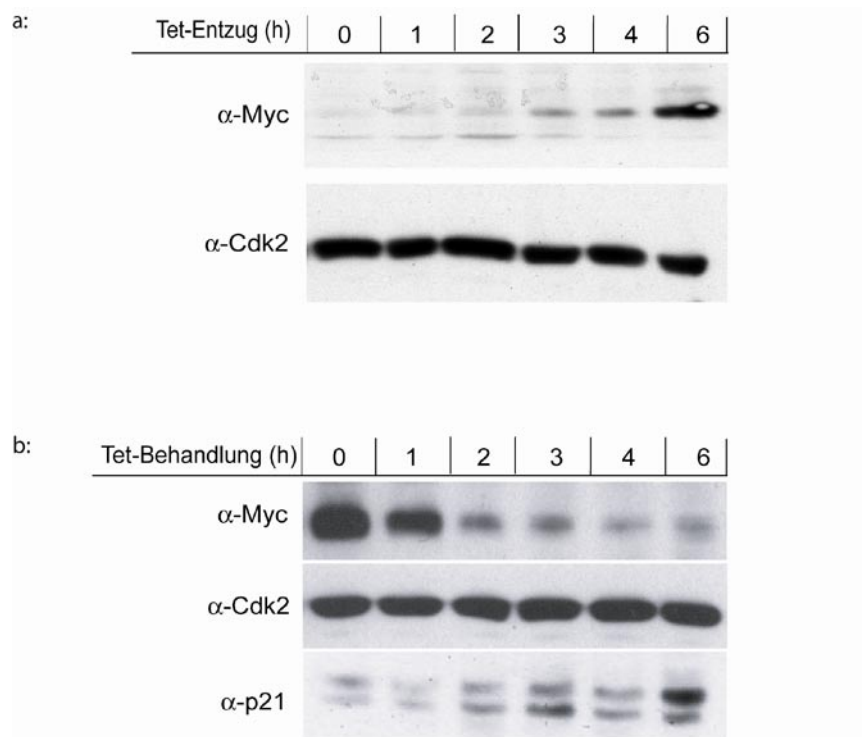


Abbildung 4: Tetrazyklin (Tet)-abhängige Regulation der c-MYC-Expression in der human B-Zell-Linie P493-6. Westernblot zum Nachweis von c-MYC sowie CDK2 als Ladekontrolle. a: Induktion der c-MYC-Expression durch Tet-Entzug. b: Repression des exogenen c-MYC-Allels durch Zugabe von Tet.

4.1.2 Regulation von MYC-Zielgenen in P493-6-Zellen

In einer früheren Microarray-Studie konnte gezeigt werden, dass in P493-6-Zellen eine große Anzahl von MYC-Zielgenen Tet-abhängig reguliert wird (Pajic et al., 2000; Schlosser et al., 2005). Um eine Transaktivierung bzw. Transrepression einiger, bekannter Zielgene (*c/EBP α* , *p57*, *NCL* und *CYCD2*) in den P493-6 Zellen genauer und unter den oben beschriebenen Bedingungen zu testen, wurde die Expression dieser Zielgene auf RNA-

Ebene zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Tet-Entzug mittels RT-PCR und anschließender qPCR (quantitative PCR, siehe 3.1.9.1) bestimmt.

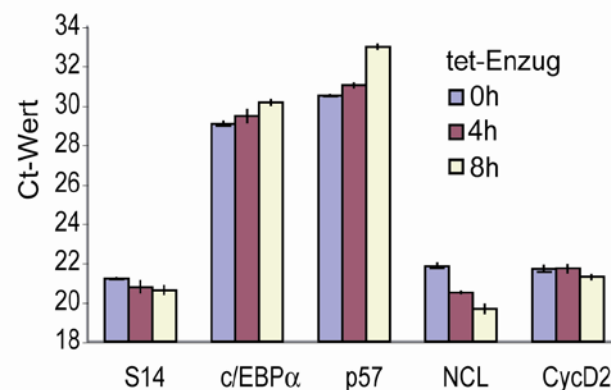


Abbildung 5: Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) zum Nachweis der Tet-abhängigen Regulation von MYC-Zielgenen in P493-6-Zellen. Die Zellen wurden 72h in Tet-haltigem Medium kultiviert. 0h (blau), 4h (rot) und 8h (gelb) nach Tet-Entzug wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in einer qPCR eingesetzt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Ct-Werte aus drei unabhängigen RNA-Proben.

Abbildung 5 zeigt das Ergebnis eines quantitativen RT-PCR-Experiments. Der dargestellte Ct (Cycle of Threshold)-Wert zeigt die Anzahl der Zyklen, welche nötig waren, um einen zuvor festgelegten Fluoreszenz-Schwellenwert zu erreichen. Ein höherer Ct-Wert deutet daher auf eine geringere Menge, ein niedriger Ct-Wert hingegen auf eine höhere mRNA-Menge in der Probe hin. Wie erwartet steigt die Expression des Myc-aktivierbaren Zielgens Nucleolin (*NCL*) nach Induktion von MYC (Tet-Entzug) an. Cyclin D2 (*CYCD2*) ist ebenfalls ein durch Myc direkt aktivierbares Zielgen (Bouchard et al., 2001; Bouchard et al., 1999), es wurde jedoch unter den beschriebenen Bedingungen in den P493-6 Zellen nicht reguliert. p57KIP2 (*CDKN1C*) und *c/EBPα* wurden zuvor als durch Myc-reprimierbare Zielgene beschrieben (Adhikary et al., 2003; Dauphinot et al., 2001; Gartel et al., 2001; Herold et al., 2002; Li et al., 1994). Beide Gene wurden nach Tet-Entzug reprimiert. Die cDNA des ribosomalen Proteins S14 wurde als nicht-reguliertes Kontrollgen amplifiziert und zeigt, dass vergleichbare Mengen Gesamt-cDNA in die Reaktionen eingesetzt wurden.

4.1.3 Genomische Myc-Bindestellen werden unterschiedlich stark von Myc besetzt

Die Tet-Behandlung der P493-6 Zellen führt zu einer starken Regulation des exogenen *MYC*-Allels und in Folge zu einer Regulation von *MYC*-Zielgenen (Abb.4 und 5). Im Folgenden sollte geklärt werden, ob und wie stark der Transkriptionsfaktor *MYC* bekannte und vermutete genomische Bindestellen in den P493-6-Zellen mit bzw. ohne exogener *MYC*-Expression (+/- *Myc*) *in vivo* besetzt. Hierzu wurden quantitative Chromatinimmunpräzipitationen (qChIPs, siehe 3.2.7) durchgeführt. Ausgehend von einer identischen Anzahl fixierter Zellen (+/-*Myc*) wurde Chromatin isoliert und fragmentiert (Input). *Myc*-Bindestellen wurden unter Verwendung des *Myc*-Antikörpers N262 aus dem fragmentierten Chromatin präzipitiert, in einer qPCR-Reaktionen amplifiziert und als relative Mengen bezogen auf den Input dargestellt (Abb.6).

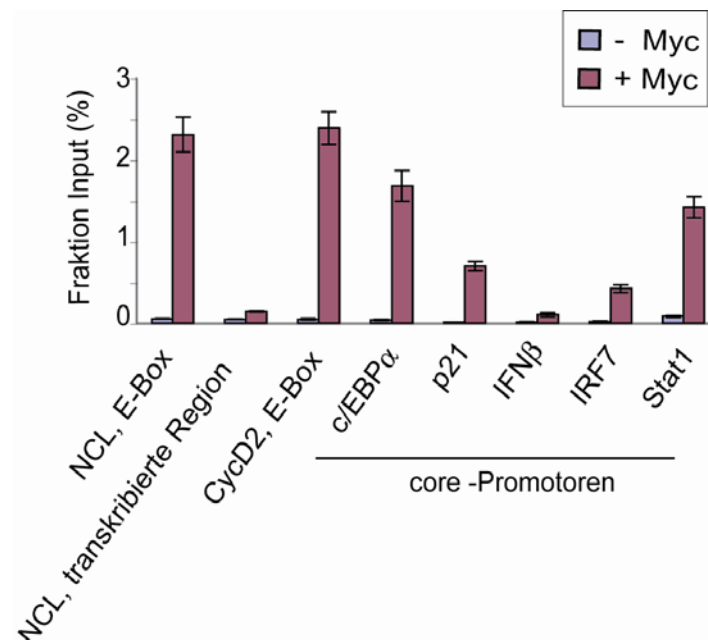


Abbildung 6: Quantitative Chromatinimmunpräzipitation (qChIP) genomischer Regionen unter Verwendung eines *Myc*-Antikörpers. Pro Ansatz wurden jeweils 2×10^7 p493-6-Zellen mit (rot) bzw. ohne *MYC*-Expression (blau) fixiert und Chromatin isoliert. Bekannte (*NCL*, *CycD2*, *c/EBPα*, *p21*) und vermutete (*IFNβ*, *IRF7*, *Stat1*) *Myc*-Bindestellen wurden unter Verwendung von α -*Myc* (N262) präzipitiert und in den angezeigten qPCR-Reaktionen (Triplikate) nachgewiesen.

Alle getesteten Myc-Bindestellen waren in dem Präzipitat aus der Probe mit MYC-Überexpression (+Myc) gegenüber der Probe ohne exogenem Myc (-Myc) deutlich angereichert.

Der Vergleich mehrerer Myc-Bindestellen untereinander zeigt, dass der Myc-Antikörper diese in unterschiedlichem Maße präzipitiert, was darauf hindeutet, dass unterschiedliche Mengen an Allelen innerhalb der Zellpopulation von Myc besetzt waren. Als Negativkontrolle diente ein genomischer Abschnitt aus dem transkribierten Bereich des Nucleolin-Gens, ca. 10kb downstream der E-Boxen. Die Myc-Besetzung dieser Region war im Vergleich zu Myc-Bindestellen deutlich niedriger und ließ sich durch das Anschalten des exogenen Myc-Allels nur geringfügig induzieren.

Für nachfolgende Experimente zur Untersuchung Myc-abhängiger Transkriptionsmechanismen wurden die Zielgene Nucleolin (*NCL*) und *c/EBP α* verglichen, da diese nach Myc-Induktion erstens wie erwartet reguliert wurden (Abb.5) und zweitens gleichermaßen starke Myc-Bindungen zeigten (Abb.6).

4.1.4 MB2-abhängige Kofaktoren werden zu aktivierten und reprimierten Zielgenen rekrutiert

Die Verwendung eines Antikörpers gegen Myc in ChIP-Experimenten zeigt eine deutliche Myc-abhängige Anreicherung von bekannten genomischen Myc-Bindestellen im Präzipitat (Abb.6). Geht man davon aus, dass sich nach der Fixierung (crosslinking) der Zellen mit Formaldehyd oder anderen crosslinking-Reagenzien wie DMA oder DMP (Kurdistani and Grunstein, 2003) auch Kofaktoren präzipitieren lassen, die indirekt an die DNA binden, sollten Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen Myc-bindende Kofaktoren ebenfalls eine Myc-abhängige Anreicherung von Myc-Bindestellen zeigen. Eine positive Anreicherung genomischer Bindestellen aus der Probe mit einer Myc-Überexpression gegenüber der Probe ohne exogenem Myc wäre somit ein indirekter Hinweis auf eine Rekrutierung des untersuchten Kofaktors durch Myc an dem untersuchten Locus.

Parallel zu den hier dargestellten Untersuchungen zur Rekrutierung von Myc-Kofaktoren wurde eine Studie veröffentlicht, in der in P493-6-Zellen eine Rekrutierung des Tip60-Komplexes, ein MB2-abhängiger Kofaktorkomplex zu aktivierten Zielgenen gezeigt wurde (Frank et al., 2003). Da jedoch zu dieser Zeit unbekannt war, ob dieser Myc-Kofaktorkomplex auch zu Myc-reprimierten Zielgenen rekrutiert wird, wurde wie oben beschrieben Chromatin aus P493-6 Zellen vor bzw. nach 3-stündiger Tetrazyklinbehandlung (+/- MYC) hergestellt und für Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen bekannte Myc-Kofaktoren des Tip60-Komplexes (α -Trrap, α -Tip60, α -Tip48/Tip49) eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurde ein Myc-Antikörper (N-262), als Negativ-Kontrolle α -Gadd45 verwendet. (Abb.7)

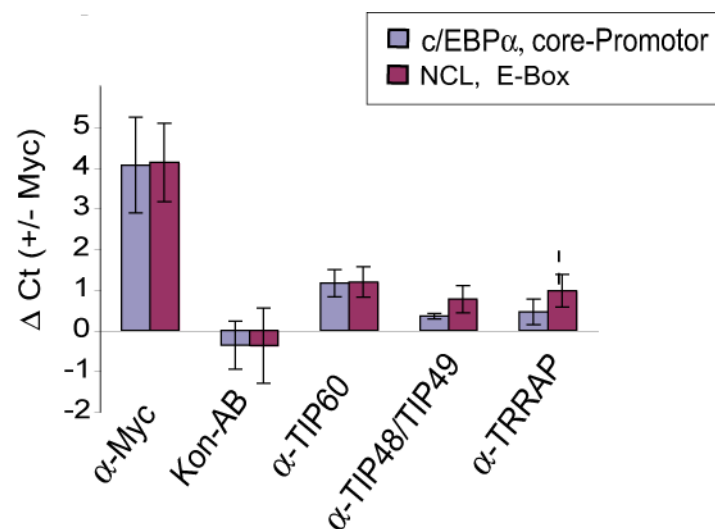


Abbildung 7: qChIP zur Quantifizierung der MYC-abhängigen Rekrutierung von MB2-abhängigen Myc-Kofaktoren. Jeweils 2×10^7 P493-6-Zellen (+ bzw. – MYC nach 3-stündiger Tet-Behandlung) wurden pro Immunpräzipitation mit den angezeigten Antikörpern eingesetzt. α -Gadd45 diente als Negativ-Kontroll-Antikörper. Dargestellt sind die Differenzwerte (Δ Ct-Werte) aus den qPCR-Reaktionen von +MYC und –MYC-Proben für die MYC-Bindestellen *c/EBP α* (blau) und *NCL* (rot).

Die Myc-Immunpräzipitation zeigte, dass die untersuchten Bindestellen von Myc (*NCL* und *c/EBP α*) bei Überexpression des Myc-Allels (+Myc) gegenüber dem Kontrollansatz (-Myc) angereichert waren (positive Differenzwerte, Δ CT). Während die Immunpräzipitation mit einem nicht-bindenden Kontroll-Antikörper (α -Gadd45) nach Myc-Induktion keine Zunahme an Myc-Bindestellen im Präzipitat aufwies, ergab sich bei Verwendung der Antikörper gegen die Myc-Kofaktoren des Tip60-Komplexes (α -Tip60, α -Tip48/Tip49, α -Trrap) eine Myc-abhängige Anreicherung (positive Δ CT-Werte) der genomischen Binderegionen sowohl des aktivierten Zielgens *NCL* als auch des reprimierten Zielgens *c/EBP α* . Hieraus ist zu schließen, dass die untersuchten Faktoren als MYC-interagierende Kofaktoren sowohl zu aktivierten als auch zu reprimierten Bindestellen von Myc im Chromatin rekrutiert werden. Die Daten gingen in die Publikation Adhikary et al., 2005 ein.

4.1.5 Myc-abhängige Rekrutierung von Tip48/Tip49 *in vitro*

Aus Abbildung 7 geht hervor, dass Tip48 und/oder Tip49 (es wurde ein bispezifischer Antikörper verwendet), möglicherweise als Bestandteil des Tip60-Komplexes Myc-abhängig zu Myc-Bindestellen rekrutiert werden. Ungefähr zeitgleich konnte in einer davon unabhängigen Studie gezeigt werden, dass Tip48 (Reptin) und Tip49 (Pontin) in *Xenopus*-Embryonen eine entscheidende Rolle in der Myc-vermittelten Repression spielen (Etard et al., 2005). Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die Rekrutierung von Tip48 und Tip49 hin zu MYC-reprimierten Zielgenen auch *in vitro* nachweisen lässt. Außerdem sollte die Frage geklärt werden, ob diese Rekrutierung vom Vorhandensein des Faktors Miz-1 abhängig ist. Hierzu wurden Oligonukleotid-Pulldown-Experimente mit immobilisierter *p21CIP1*-Promotor-DNA durchgeführt.

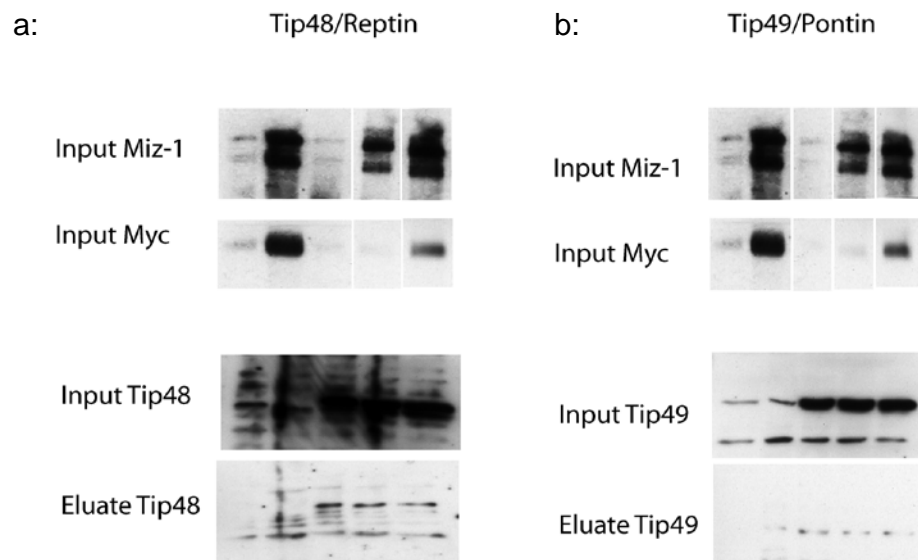


Abbildung 8: Oligonukleotid-Pulldown zum Nachweis von *in vitro* Bindung von Tip48/Reptin (a) und Tip49/Pontin (b) an das Myc/Miz-reprimierte Promotor-Element von *P21/CIP1*. HeLa-Zellen mit Überexpression der angezeigten Proteine wurden mit einem biotinylierten Promotorfragment des *p21*-Genes inkubiert. Gebundene Proteine wurden eluiert und im Westernblot nachgewiesen.

Das verwendete, biotinylierte Promotorfragment wurde bereits in früheren Studien als Bindungsregion sowohl für Miz-1 als auch für Myc nachgewiesen (Wu et al., 2003). HeLa-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für Miz-1, Myc, Tip48 und Tip49 in den angezeigten Kombinationen transfiziert und die Lysate wurden zusammen mit dem biotinylierten Promotorfragment in ein Oligopulldown-Experiment eingesetzt (Abb. 8).

Die Überexpression der angezeigten Proteine in den Lysaten wurde als Input, die Bindung der Faktoren an die DNA als Bestandteil der Eluate in einem Westernblot nachgewiesen. Man sieht, dass TIP48 und TIP49 an das Promotorfragment unabhängig von MIZ-1 und MYC banden und diese Bindung durch die Überexpression von MYC und MIZ-1 nicht verstärkt wurde.

4.1.6 Myc-abhängige Histon-Acetylierung findet auch an Myc-reprimierten Zielgenen statt

Der Tip60-Komplex ist ein Histon-Acetyltransferasekomplex, die namensgebende Untereinheit des Komplexes, Tip60, ist eine Histon-Acetyltransferase mit einer Substratpräferenz für Histon H4. Eine Myc-abhängige Histon-Acetylierung an E-Boxen einiger Myc-Zielgene wurde bereits in früheren Studien beschrieben (Bouchard et al., 2001; Frank et al., 2001).

Abb.7 zeigt, dass mehrere Untereinheiten des TIP60-Komplexes auch zu dem Myc-reprimierten Zielgen *c/EBP α* rekrutiert werden. Um zu untersuchen, ob es sich hierbei um einen funktionellen Komplex handelt, wurde durch Chromatinimmunpräzipitationen mit einem Antikörper gegen (tri)acetyliertes Histon H4 untersucht, ob die Histone in der Nähe dieser Myc-reprimierten Bindestelle ebenfalls Myc-abhängig modifiziert werden. Abb 9 zeigt eine deutliche, Myc-abhängige Zunahme der Histon-H4-Acetylierung sowohl am *NCL*- als auch am *c/EBP α* -Gen.

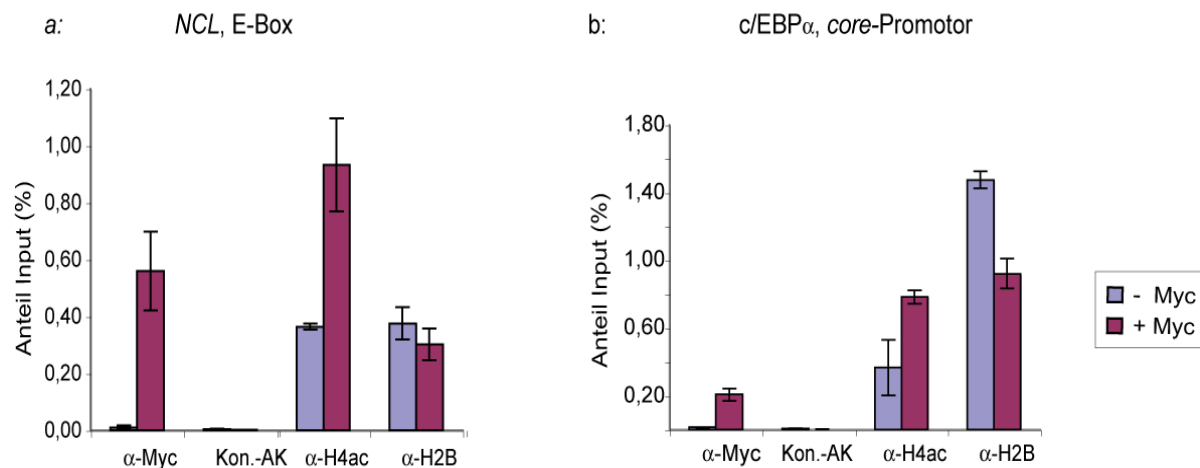


Abbildung 9: qChIP zum Nachweis Myc-abhängiger Acetylierung von Histon H4.

Jeweils 2×10^7 P493-6-Zellen (- Myc nach 0h Tet-Entzug, + Myc nach 8h Tet-Entzug) wurden pro Immunpräzipitation mit den angezeigten Antikörpern eingesetzt. α -Myc (N262) diente als Positivkontrolle, α -Gadd45 als Negativkontrolle. Die präzipitierten Myc Bindestellen *NCL* (a) und *c/EBP α* (b) wurden in einer Triplikat-qPCR amplifiziert und als Anteil des in die Immunpräzipitation eingesetzten Chromatins (Input) dargestellt.

Um auszuschließen, dass die unterschiedlichen Mengen an Histonmodifikationen auf unterschiedlichen Mengen an Gesamt-Histonen beruht, wurde parallel unmodifiziertes Histon H2B immunpräzipitiert. Die Myc-Induktion hatte an der Bindestelle des aktivierten Zielgens *NCL* keinen Einfluss auf die Menge an H2B, am *c/EBP α* -Locus war die Menge an H2B nach Myc-Induktion verringert, was auf eine Dekondensation des Chromatins hindeutet. Dieser beobachtete Effekt wurde nicht weitergehend untersucht, zeigt jedoch, dass die Zunahme an H4-Acetylierung in diesem Experiment möglicherweise noch unterschätzt wird. Zusammengenommen kann man schließen, dass Myc die Histonmodifikation (H4-Acetylierung) an beiden Zielgenen induziert ohne die Nukleosomendichte zu erhöhen. Dies deutet darauf hin, dass ein in Bezug auf die Histon-Acetylierungsaktivität funktioneller TIP60-Komplex zu Myc-aktivierten und -reprimierten Genen rekrutiert wird.

4.1.7 Myc induziert die Serin5-Phosphorylierung der RNAPII

In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass Myc mit dem Elongationsfaktor P-TEFb interagiert, der über seine Kinaseuntereinheit Cdk9/CycT1 eine Serin 2-Phosphorylierung der CTD des RNAPII-Komplexes am Promotor des aktivierten Zielgens *Cad* induziert (Eberhardy und Farnham, 2001). Konsistent hierzu konnte in Mauszellen, die ein induzierbares Myc-ER-Allel exprimieren, am *CycD2*-Promotor eine MB2-unabhängige Rekrutierung von Cdk9 nachgewiesen werden (Bouchard et al., 2004). Außerdem wurde in dieser Studie eine MB2-abhängige Rekrutierung von TFII-H am *CycD2*-Promotor gefunden, was eine Myc-induzierte CTD-Phosphorylierung auch am Serin 5 vermuten lässt.

Um zu überprüfen, welche Myc-abhängigen CTD-Phosphorylierungen in P493-6-Zellen nachweisbar waren, wurden wie oben beschrieben qChIP-Experimente durchgeführt (Abb.10). Unter den hier gewählten Bedingungen waren am *NCL*- und *c/EBP α* -Gen keine Myc-abhängigen Rekrutierungen von TFII-H und Cdk9 nachweisbar (Daten nicht gezeigt), auch konnte keine Myc-

abhängige Zunahmen von Serin2-Phosphorylierung an den untersuchten Loci gefunden werden (Abb. 10a).

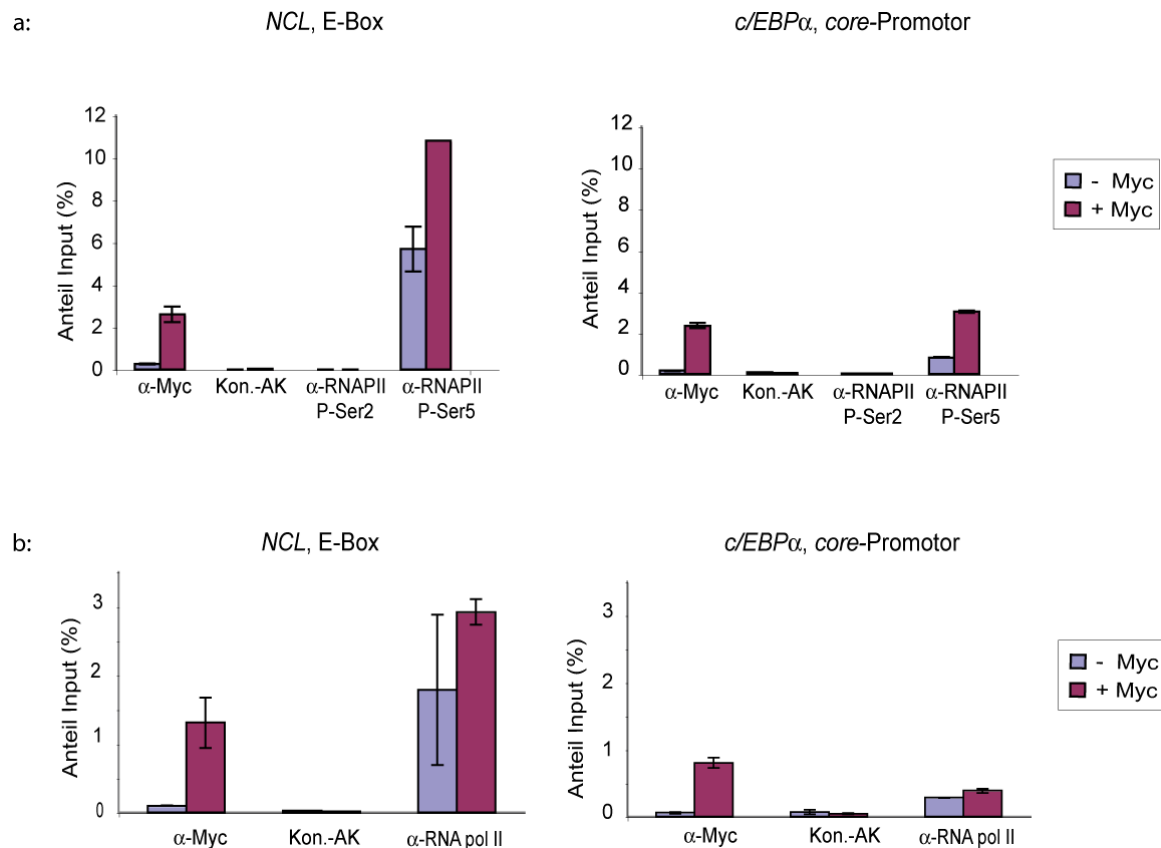


Abbildung 10: qChIP in P493-6-Zellen zum Nachweis Myc-abhängiger CTD-Phosphorylierung an Myc-Zielgenen. Jeweils 2×10^7 P493-6-Zellen (- Myc nach 0h Tet-Entzug, + Myc nach 8h Tet-Entzug) wurden pro Immunpräzipitation mit den angezeigten Antikörpern eingesetzt. α -RNA pol II Ser2 und α -RNA pol II Ser5 (a) erkennen die CTD-phosphorylierten Formen des RNAPII-Komplexes, α -RNA pol II (b) erkennt den Polymerasekomplex unabhängig von CTD-Phosphorylierungen. α -Myc (N262) diente als Positivkontrolle, α -Gadd45 als Negativkontrolle (Kon.-AK). Die präzipitierten Myc Bindestellen *NCL* und *c/EBPα* wurden in einer Triplikat-qPCR amplifiziert und als Anteil des in die Immunpräzipitation eingesetzten Chromatins (Input) dargestellt.

Es konnte eine deutliche Zunahme an Serin5-Phosphorylierung nach Myc-Induktion sowohl am *c/EBPα*-Promotor als auch an der E-Box des *NCL*-Gens beobachtet werden (Abb.10a). Um zu überprüfen, ob die Zunahme der CTD-Modifikation auf eine Zunahme der Gesamt-RNAPII beruht wurde eine Immunpräzipitation gegen unmodifizierte RNAPII (α -RNA pol II, 8WG16,

Abcam) durchgeführt (Abb.10b). Beide untersuchten Loci ließen sich hierbei deutlich präzipitieren, was auf eine Beladung beider Gene mit dem RNAPII-Komplex hinweist, und es zeigte sich an beiden Loci keine Myc-Abhängigkeit in der RNAPII-Beladung.

4.1.8 Der Myc-Kofaktor p300 wird differenziell von Myc rekrutiert.

Die ChIP-Experimente in Abb.7 zeigen, dass die MB2-abhängigen Kofaktoren des Tip60-Komplexes von Myc nicht-differentiell, d.h. sowohl zu einem aktivierten als auch reprimierten Zielgen rekrutiert wurden. Um zu testen, ob auch MB2-unabhängige Myc-Kofaktoren gleichermaßen zu aktivierten und reprimierten Zielgenen gezogen werden, wurde ein qChIP-Experiment mit p300-Antikörper durchgeführt.

Abb.11 zeigt, dass α -p300 die E-Box-Region des *NCL*-Gens nach Myc-Induktion deutlich anreicherte (-Myc 0,05%, +Myc 0,13%), während die Binderegion des reprimierten Gens unabhängig von der Myc-Expression gleichermaßen stark von p300 besetzt war (-Myc 0,19%, +Myc 0,20%). Als Positivkontrolle diente eine Immunpräzipitation mit α -Myc (N262), wobei sich die Myc-Bindestellen nach Tet-Entzug stark im Präzipitat anreicherten: *NCL* E-Box von 0,25% auf 2,58% nach Tet-Entzug, der *c/EBP α core* -Promotor von 0,17% auf 2,37% (Daten nicht gezeigt).

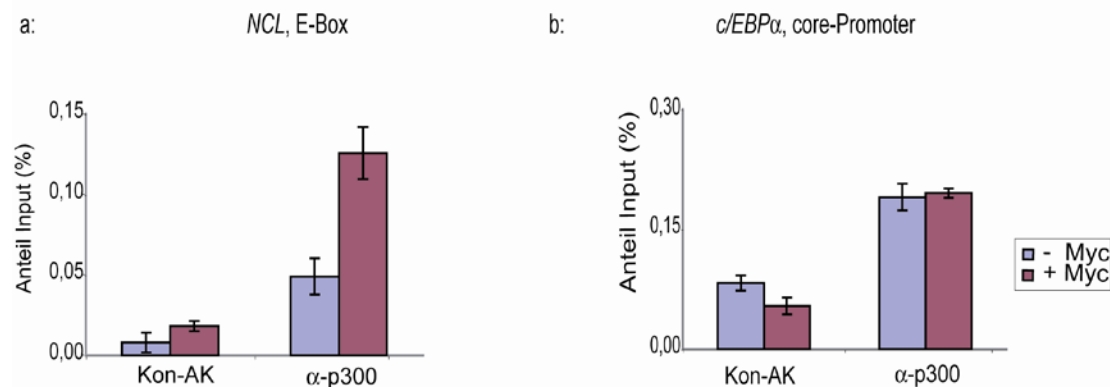


Abbildung 11: qChIP zum Nachweis Myc-abhängiger Rekrutierung des MB2-unabhängigen Myc-Kofaktors p300. Gleiche Mengen Chromatin aus P493-6-Zellen (- Myc nach 0h Tet-Entzug, + Myc nach 8h Tet-Entzug) wurden in Immunpräzipitationen mit den angezeigten Antikörpern eingesetzt. α -Myc diente als Positivkontrolle, α -Gadd45 als Negativkontrolle. Die präzipitierten Myc Bindestellen *NCL* (a) und *c/EBP α* (b) wurden in einer Triplikat-qPCR amplifiziert und als Anteil des in die Immunpräzipitation eingesetzten Chromatins (Input) dargestellt.

4.2 Interaktion zwischen Myc und dem Mediatorkomplex

In einer *in vitro* Studie zur Interaktion des N-Terminus von Myc mit Kofaktoren wurde Cdk8, eine fakultative Untereinheit des inaktiven oder repressiven Mediator-Komplexes nachgewiesen (Eberhardy and Farnham, 2001; Eberhardy and Farnham, 2002). Darüber hinaus konnte in einer Studie zu Myc-abhängigen Rekrutierungen von Kofaktoren in Maus-Zellen, die ein aktivierbares Myc-ER-Konstrukt exprimieren, eine Rekrutierung der Mediator-Untereinheit Med1/Trap220 an den CYCD2-Promotor nachgewiesen werden (Bouchard et al., 2004). Die Rekrutierung des Mediators war in diesem Fall ebenfalls MB2-unabhängig. In der vorliegenden Studie wurde die Interaktion zwischen Myc und dem Multiproteinkomplex biochemisch und funktionell untersucht.

4.2.1 Die aktive Form des Mediator-Komplexes lässt sich *in vitro* aus Kernextrakten mit GST-Myc besser aufreinigen als die Cdk8-haltige, inaktive Form

Um zu überprüfen, ob GST-Myc den endogenen Mediatorkomplex aus Kernextrakt präzipitieren kann, und falls ja, ob es sich um die Cdk8-enthaltende, inaktiven Form des Mediatorkomplexes handelt, wurden GST-Pulldown-Experimente durchgeführt, wobei neben Cdk8 auch solche Untereinheiten nachgewiesen wurden, welche obligat in allen Formen des Komplexes (also auch in dem aktiven, Cdk8-freien) vorkommen.

4.2.1.1 Klonierung und prokaryotische Expression von GST-Myc-Allelen

Die humane cDNA des N-Terminus von Myc (Nukleotide 4-496) wurde über PCR aus den Plasmiden pcDNA3-Myc, pcDNA3-Myc Δ MB1 und pcDNA3-Myc Δ MB2 amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und XhoI in den Vektor pGex4T3 einkloniert. Dieser Vektor stellt einen prokaryotischen Promotor sowie einen GST-Tag zur Verfügung, an dessen 3'Ende die drei Myc cDNAs in den offenen Leserahmen einkloniert wurden. Wie unter 3.2.9 und 3.2.10 beschreiben, wurden die GST-Myc-Allele sowie GST alleine in BL21-Zellen exprimiert und unter Verwendung von Glutathion-Sepharose-Beads aus dem Lysat der Bakterien aufgereinigt (Abb.12).

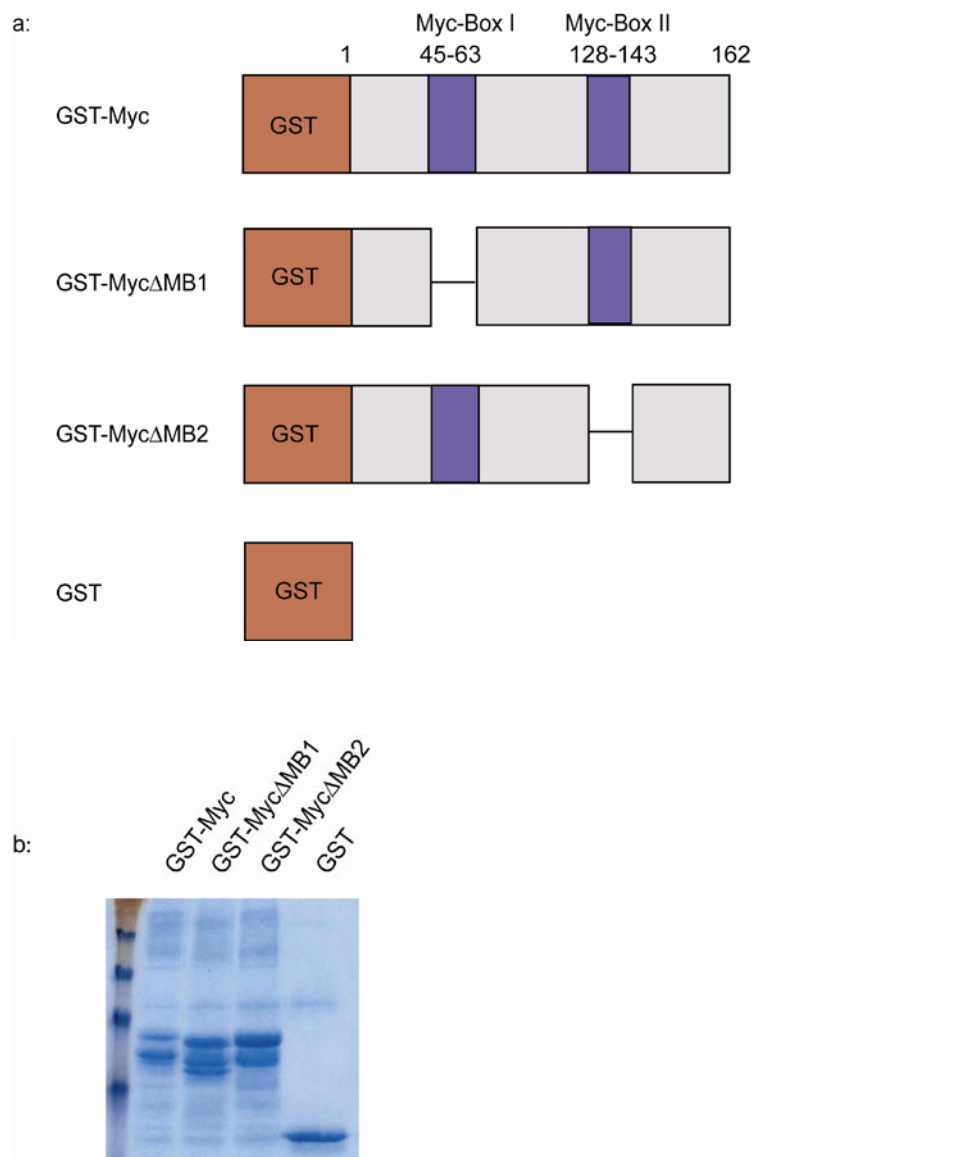


Abbildung 12: Expression und Aufreinigung von GST-markierten Myc-Allelen aus E.coli.

a: Schematische Darstellung der Myc-Allele mit N-terminaler GST-Fusion. b: Coomassie-Färbung der mit Glutathion-Sepharose aufgereinigten und in einer SDS-PAGE aufgetrennten Fusionsproteine.

Um den Erfolg der Aufreinigung zu überprüfen, wurde ein kleiner Teil des Eluates in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Farbstoff angefärbt. Man erkennt, dass die Fusionsproteine im Eluat sehr stark angereichert waren. Die Menge an rekombinanten Proteinen wurde mit Hilfe einer Standardreihe BSA abgeschätzt (nicht gezeigt).

4.2.1.2 Aufreinigung des endogenen Mediatorkomplexes aus Kernextrakten

Um zu überprüfen, ob der endogene Mediatorkomplex mit dem N-Terminus von Myc interagiert, wurden GST-Pulldown-Experimente (siehe 3.2.12) durchgeführt. Hierzu wurde pro Ansatz 10 µg des Fusionsproteins (GST-Myc sowie GST als Kontrolle, siehe Abb.12b) an Sepharose-Beads gekoppelt. Anschließend wurde Kernextrakt aus HeLa-Zellen mit diesen Fusionsproteinen versetzt und die an das rekombinante Protein bindenden Komponenten aus dem Kernextrakt aufgereinigt. Der Input (1% des in die Reaktion eingesetzten Kernextraktes) sowie die Eluate der Pulldownreaktionen wurden in zwei SDS-PA-Gelelektrophoresen aufgetrennt. Die Proteine des einen Gels wurden durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht (Abb.13a). Die in die Reaktion eingesetzten, rekombinanten Proteine GST-Myc und GST sind im Eluat als prominente Banden zu erkennen.

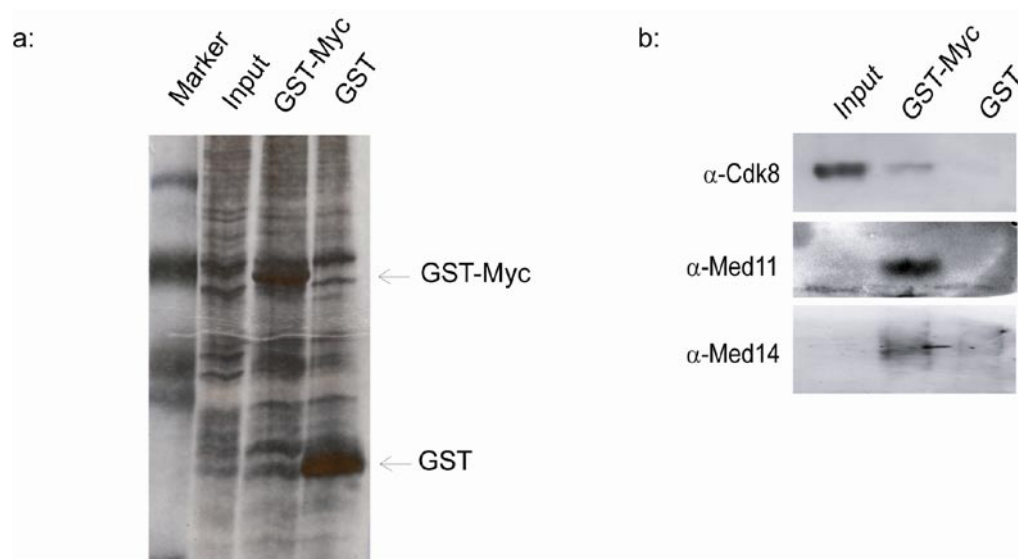


Abbildung 13: GST-Pulldown aus HeLa-Kernextrakt. Aus jeweils 1mg HeLa-Kernextrakt wurden mit GST-Myc und GST und Glutathion-Sepharose *in vitro* bindende Proteine isoliert. Silberfärbung (a) und Westernblot gegen Mediator-Untereinheiten (b), aufgetragen sind jeweils 1% vom Input (10 µg) sowie 25% der Eluate aus den Pulldown-Reaktionen.

Während in der Silberfärbung die GST-Myc-Probe und die GST-Probe ein vergleichbares Bandenmuster unspezifisch bindender Proteine erkennen lässt, zeigte sich im Westernblot gegen Untereinheiten des Mediatorkomplexes eine

deutliche Anreicherung einiger Faktoren in der Myc-GST-Probe gegenüber der GST-Probe (Abb.13b). Hieraus kann geschlossen werden, dass der Mediator-Komplex selektiv an Myc-GST bindet. Es zeigte sich, dass Med11 und Med14 im Eluat der Pulldownreaktion sehr stark, Cdk8 dagegen deutlich geringer angereichert waren. Die verhältnismäßig geringe Menge von Cdk8 im Eluat deutet darauf hin, dass GST-Myc bevorzugt die aktive, Cdk8-freie Form des Mediator-Komplexes bindet.

4.2.2 *In vitro* Interaktion einzelner Mediator-Untereinheiten mit GST-Myc

Bei dem oben beschriebenen GST-Pulldown aus Kernextrakt werden sowohl direkt als auch indirekt bindende Proteine und Proteinkomplexe aufgereinigt. Es war somit unklar, welche Untereinheit des Mediator-Komplexes direkt mit Myc interagiert. Zur Klärung dieser Frage wurden 22 Untereinheiten des Komplexes separat *in vitro* translatiert (cDNA aller Mediator-Untereinheiten sind Flag-getaggt und von P. Farnham zur Verfügung gestellt) und durch Zugabe von L-[³⁵S]-Methionin (Amersham Pharmacia) radioaktiv markiert. Anschließend wurde die Bindung der *in vitro* translatierten Proteine an GST-Myc in einem IVT-GST-Pulldown-Experiment (siehe 3.2.15) nachgewiesen.

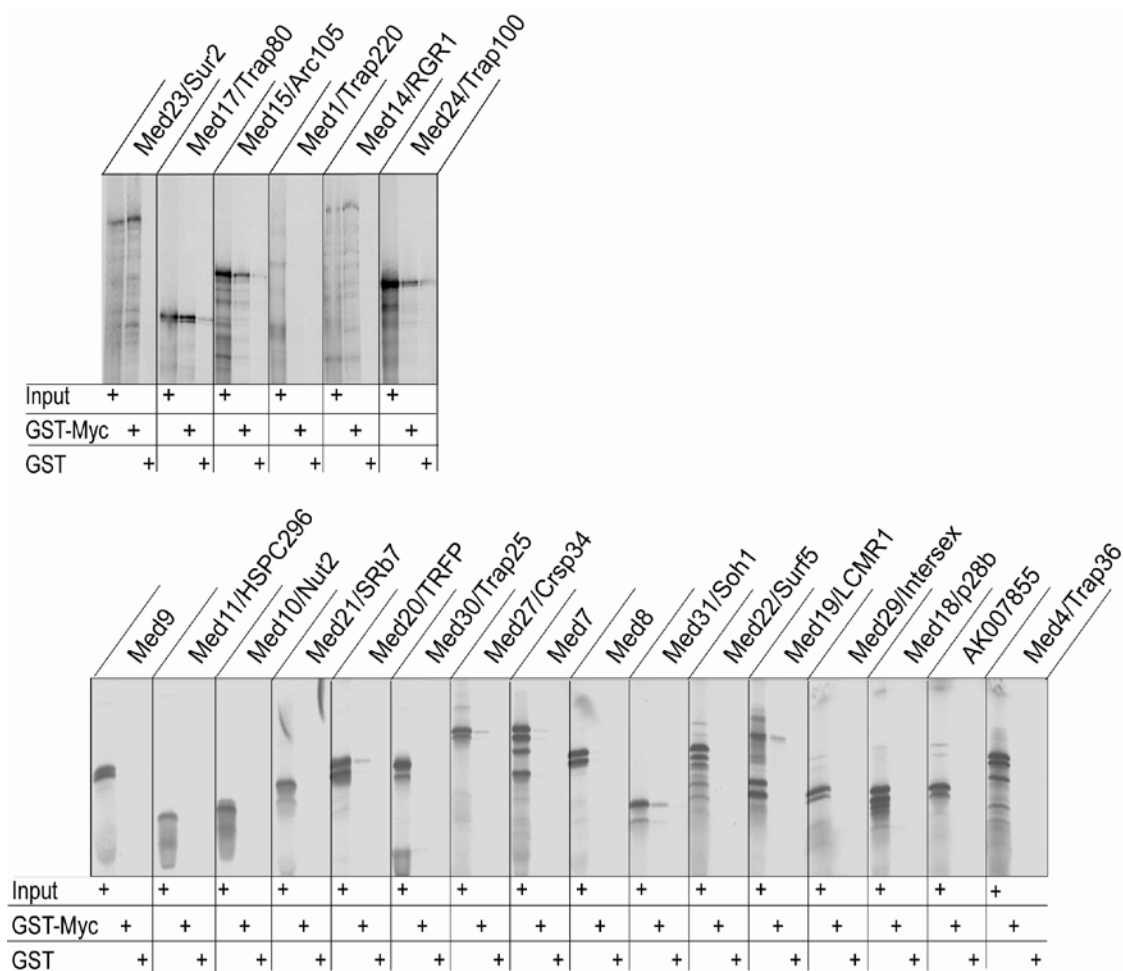


Abbildung 14: IVT-GST-Pulldown zum Nachweis der Affinität von Mediator-Untereinheiten zu Myc. Die angezeigten Untereinheiten des Mediatorkomplexes wurden *in vitro* translatiert und ^{35}S -markiert. Gleiche Mengen des Translationsprodukts (Input) wurden mit GST-Myc sowie mit GST inkubiert und mit Hilfe von Glutation-S-Sepharose affinitätsaufgereinigt. Es wurden jeweils 25% des Inputs sowie 50% der Eluate in einer SDS-PAGE aufgetrennt, ^{35}S -markierte Proteine wurden in einem Autoradiogramm nachgewiesen.

Abb.14 zeigt ein Autoradiogramm, wobei jeweils 25% der in den Pulldown eingesetzten IVT-Ansätze (Input) sowie 50% der Eluate (GST-Myc und als Kontrolle GST alleine) in einer SDS-PAGE aufgetragen wurden.

Man erkennt, dass einige Mediator-Untereinheiten (wie Med23/Sur2, Med17/Trap80, Med15/Arc105, Med14/RGR1, Med24/Trap100) stark im Eluat des jeweiligen GST-Myc-Ansatzes gegenüber der GST-Kontrolle angereichert

waren. Zahlreiche Untereinheiten zeigten dagegen keine bzw. nur eine schwache Interaktion zu GST-Myc, was auf eine spezifische Interaktion der positiven Untereinheiten mit Myc hindeutet.

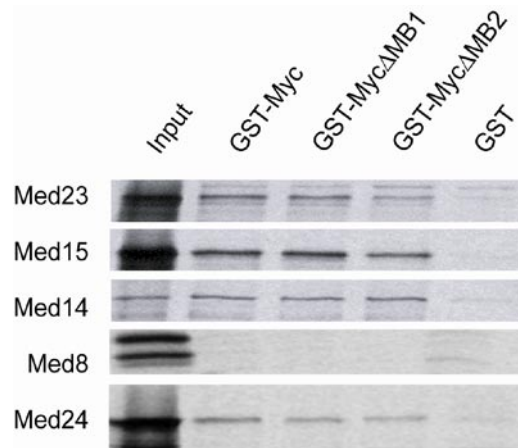


Abbildung 15: Autoradiogramm zur Darstellung der *in vitro* translatierten und ^{35}S -markierten Mediator-Untereinheiten sowie deren Bindung an verschiedene GST-Myc-Allele. Mit den aus Bakterienlysaten aufgereinigten GST-Myc-Proteinen (Abb.12b) und den angezeigten *in vitro* translatierten und ^{35}S -markierten Mediator-Untereinheiten (Abb.14, Inputs) wurde ein IVT-GST-Pulldown durchgeführt. 20% vom Input sowie jeweils 50% der Eluate wurden in einer PAGE aufgetrennt, ^{35}S -markierte Proteine wurden in einem Autoradiogramm nachgewiesen.

Die positiven Untereinheiten (außer Med17, das sehr stark zu unspezifischen Bindungen neigt (Joan Conaway, persönliche Mitteilung)) wurden in einem weiteren IVT-GST-Pulldown unter Verwendung von GST-Myc-Allelen getestet, bei denen die hoch-konservierten Bereiche (MB1 und MB2) innerhalb des Myc-Proteins deletiert sind (Abb.12b). Die Interaktion zwischen GST-Myc und den Mediator-Untereinheiten Med23, Med15, Med14 und Med24 waren hierbei erneut positiv und Med8 wie zuvor negativ (Abb.15). Die positiven Interaktionen bestanden ebenfalls bei den Allelen MycΔMB1 (interne Deletion der Aminosäuren 45-63) und MycΔMB2 (interne Deletion der Aminosäuren 128-143), und sind somit unabhängig von diesen hoch-konservierten Bereichen von Myc.

4.2.3 *In vivo* Interaktion einzelner Mediator-Untereinheiten mit Myc

Mediator-Untereinheit, die in den oben beschriebenen IVT-GST-Pulldownexperimenten spezifische Interaktionen mit Myc zeigten, sollten im Folgenden auf ihre Affinität zu Myc *in vivo* untersucht werden. Hierzu wurden sie mit bzw. ohne Myc in HeLa-Zellen exprimiert und die Zelllysate in ein Koimmunpräzipitationsexperiment (siehe 3.2.6) eingesetzt.

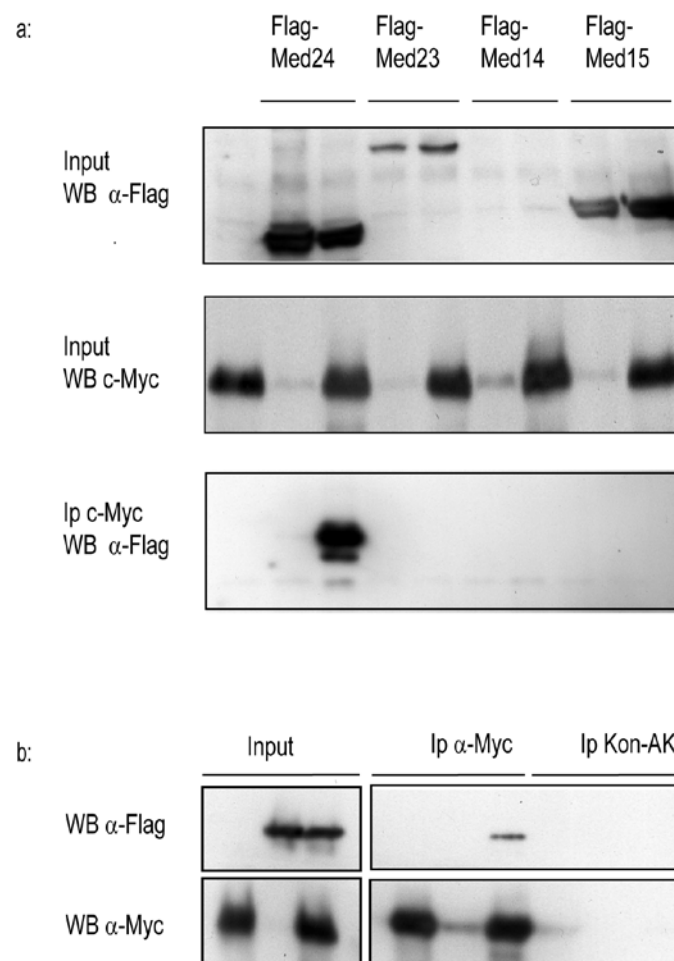


Abbildung 16: *In vivo* Interaktion zwischen c-Myc und Untereinheiten des Mediator-Komplexes. (a) HeLa-Zellen wurden mit Myc und/oder den angezeigten Mediator-Untereinheiten transfiziert. Die Zell-Lysate wurden in eine Koimmunpräzipitation mit α -Myc eingesetzt, gebundene Mediatorkomponenten wurden im Westernblot mit α -Flag nachgewiesen. (b) Koimmunpräzipitation zwischen Myc und Med24 in Phoenix-Zellen, als Kontroll-Antikörper (KonAK) wurde α -Bcl-2 benutzt.

Abb.16 zeigt, dass sich die Untereinheiten Med24, Med23 und Med15 in den Zellen exprimieren ließen, wobei nur Med24 mit Myc interagierte.

Die *in vitro* ebenfalls positive Untereinheit Med14/Rgr1 ließ sich *in vivo* nicht exprimieren. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass diese Untereinheit ebenfalls positiv wäre, wenn sie sich in stärkerem Maße exprimieren ließe.

Abb.16b zeigt ein weiteres Koimmunpräzipitationsexperiment in Phoenix-Zellen, bei dem unter Verwendung eines Myc-Antikörpers die Aufreinigung von Med24 möglich war, nicht jedoch bei Verwendung eines Kontroll-Antikörpers (Kon-AK, α -Bcl-2), was auf eine spezifische Bindung von Med24 an Myc hindeutet.

4.2.4 Die *in vivo* Interaktion zwischen Myc und Med24 lässt sich nicht auf eine einzelne Region innerhalb des Myc Proteins eingrenzen

Um die Region innerhalb des Myc-Proteins zu identifizieren, welche für die Interaktion mit Med24 verantwortlich ist, wurden Koimmunpräzipitationsexperimente nach Überexpression von Flag-getaggttem Med24 sowie Myc-Allelen durchgeführt, bei denen sukzessiv der N- bzw. der C-Terminus trunkiert wurde.

Abb.17b zeigt einen Westernblot, bei dem zunächst die Überexpression der Proteine im Lysat (Input) nachgewiesen wurde. Nach der Immunpräzipitation mit anti-Myc (C40, von Andreas Trumpp zur Verfügung gestellt) wurde kopräzipitiertes Med24 im Westernblot unter Verwendung eines Flag-Antikörpers nachgewiesen. Alle verwendeten Myc-Allele mit N-terminalen Verkürzungen zeigten eine mit Myc-Wildtyp vergleichbar starke Interaktion mit Med24.

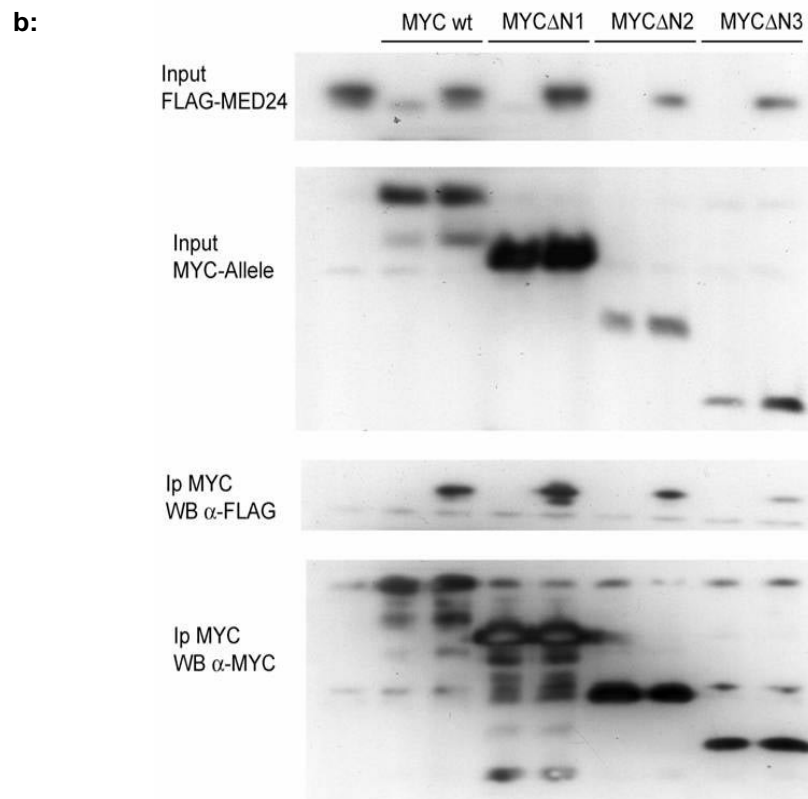
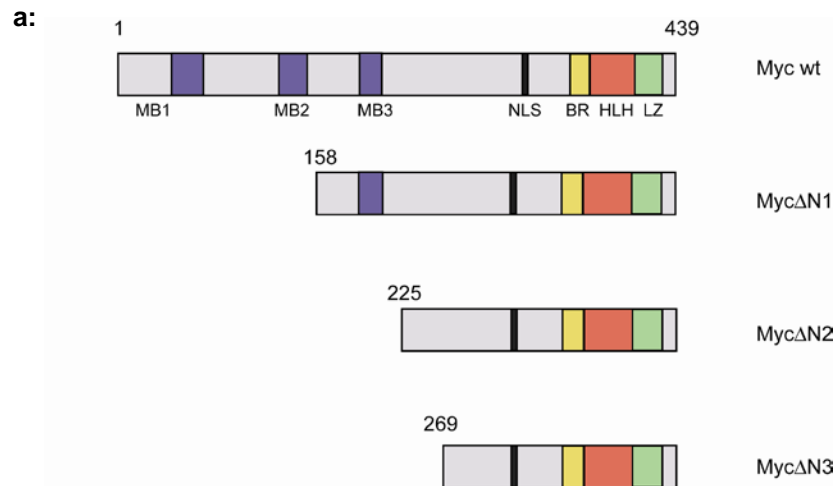


Abbildung 17: Die *in vivo* Interaktion zwischen Myc und Med24 hängt nicht vom N-Terminus von Myc ab. Med24 und die angezeigten Myc-Allele wurden in Phoenix-Zellen überexprimiert. Die Lysate wurden mit α-Myc (C40) immunpräzipitiert und im Westernblot wurde kopräzipitiertes Flag-Med24 nachgewiesen.

Im Folgenden wurden die Koimmunpräzipitationsexperimente mit Myc-Allelen durchgeführt, bei denen der C-Terminus sukzessiv trunkiert wurde (Abb.18). Die Immunpräzipitation wurde mit α -Myc N262 durchgeführt.

Das Fehlen des C-Terminus ab Aminosäure 368 (Myc Δ C1) schränkte die Affinität der beiden Proteine zueinander nicht ein. Die Allele Myc Δ C2 und Myc Δ C3 binden jedoch nicht mehr an Med24. Da bei diesen Myc-Allelen das Kernlokalisierungssignal (nuclear localisation signal, NLS) von Myc fehlt und sie nicht wie Myc-Wildtyp im Kern, sondern im Zytoplasma lokalisieren, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die fehlende Interaktion auf eine räumliche Trennung der beiden Proteine innerhalb der Zelle zurückzuführen ist. Deshalb wurde über eine PCR ein artifizielles NLS (SV40) an die cDNA von Myc Δ C2 und Myc Δ C3 angefügt und in den Expressionsvektor pcDNA3 kloniert. Die Expression des NLS-Myc Δ C2 wurde im Westernblot bestätigt und über eine Immunfluoreszenz konnte bestätigt werden, dass NLS-Myc Δ C2 im Gegensatz zu Myc Δ C2 im Kern lokalisiert (Daten nicht gezeigt). NLS-Myc Δ C3 zeigte keine Kernlokalisierung in der Immunfluoreszenz und wurde daher nicht für weiterführende Experimente verwendet. Abb.18c zeigt, dass NLS-Myc Δ C2 mit Med24 interagiert.

Außerdem zeigten Myc-Allele, bei denen interne Regionen deletiert sind (Myc Δ D: Aminosäure 190 bis 252 und Myc Δ PEST: 206 bis 269) keine deutliche Verringerung ihrer Affinität zu Med24 (Abb.19). In dem hier dargestellten Experiment erscheint die Bindung zwischen Myc Δ PEST und Med24 zwar reduziert, dieser Effekt ist jedoch vermutlich auf die schwächere Expression von Flag-Med24 zurückzuführen (Abb.19, Input Flag-Med24). Ebenfalls zeigte ein Myc-Allel mit interner Deletion der Aminosäuren 264-295 uneingeschränkt starke Bindung des Flag-Med24-Proteins (Dorothea Maaß, persönliche Mitteilung).

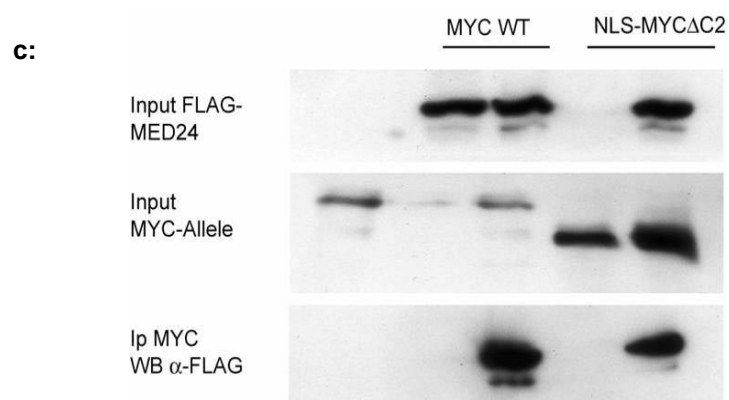
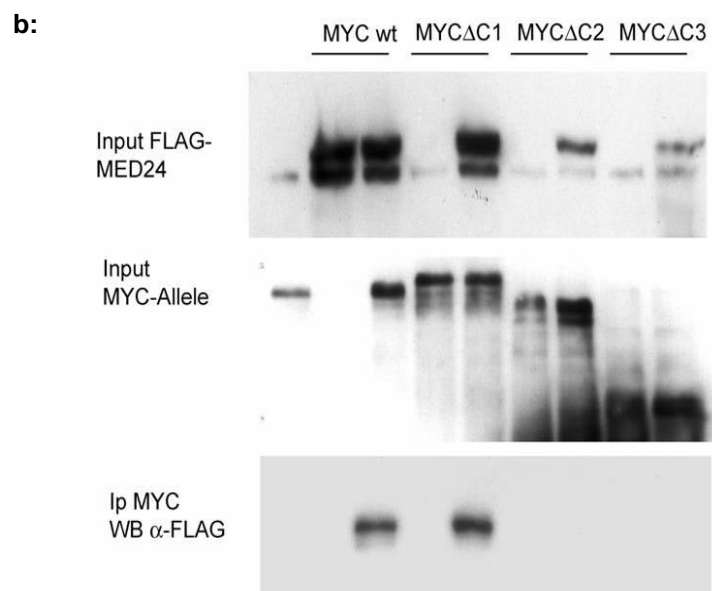
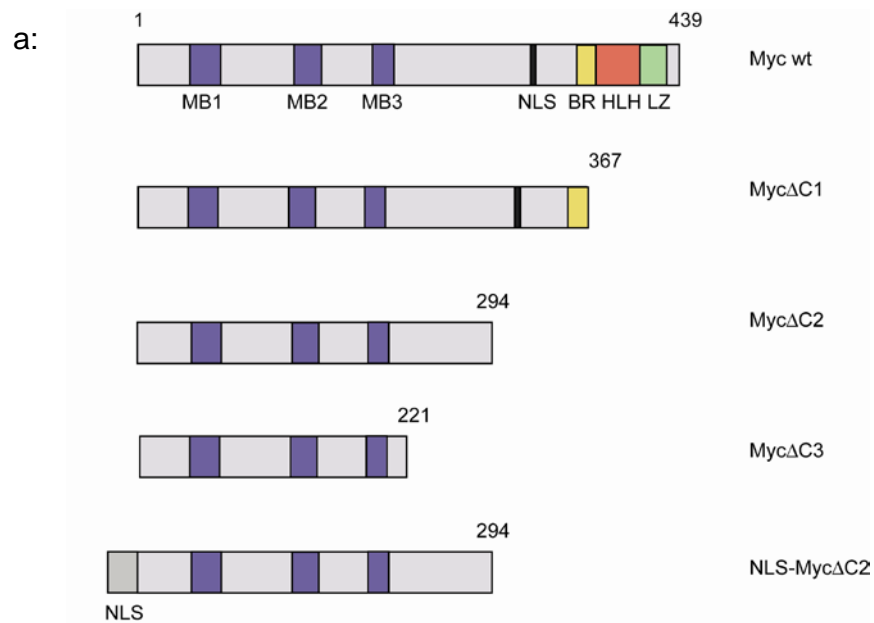


Abbildung 18: Die *in vivo* Interaktion zwischen Myc und Med24 hängt nicht vom C-Terminus, jedoch von der nukleären Lokalisation von Myc ab. (a) Schematische Darstellung der in die Koimmunpräzitationen eingesetzten Myc-Allele. (b) Die Lysate aus Phoenix-Zellen mit überexprimierten Med24 und Myc-Allelen wurden mit α -Myc (N-262) immunpräzipitiert und im Westernblot kopräzipitiertes Flag-Med24 nachgewiesen (c) An die cDNA von Myc Δ C2 wurde N-terminal ein artifizielles Kernlokalisierungssignal (Nuclear Lokalisation Signal, NLS) fusioniert und in eine Koimmunpräzitation mit Med24 eingesetzt. α -Myc-bindende Proteine wurden in einem Westernblot mit α -Flag nachgewiesen.

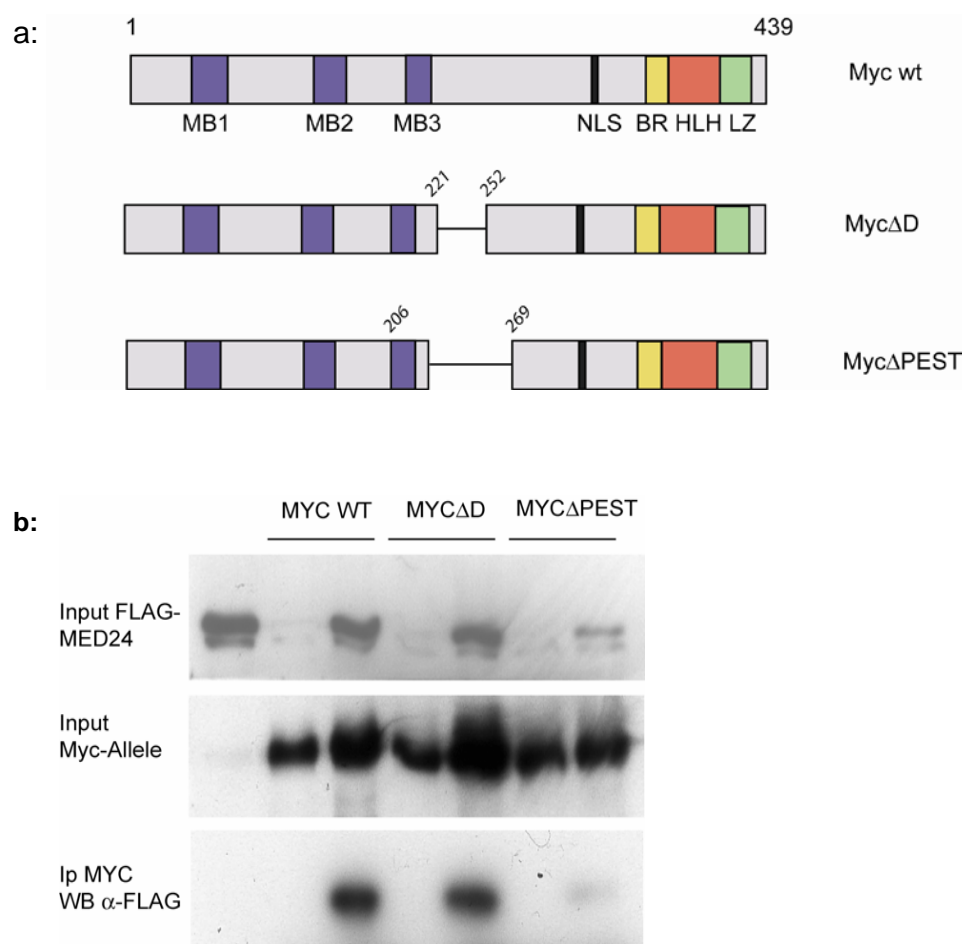


Abbildung 19: *In vivo* Interaktion zwischen Flag-Med24 und Myc-Allelen mit interner Deletion. (a) Schematische Darstellung der verwendeten Myc-Allele. (b) Westernblot zur Darstellung der Überexpression der angezeigten Proteine in Phoenix-Zellen (Input) und des mit α -Myc N262 immunpräzipitierten Flag-Med24.

4.2.5 Die Myc-abhängige Transaktivierung *in vivo* lässt sich durch die Überexpression von Med24 nicht verstärken

Myc ist in der Lage, in transienten Reporterassays die Transkription von Reportergen zu stimulieren, deren Promotoren E-Boxen enthalten und von Myc/Max-Heterodimeren gebunden werden. Solch ein Reporterkonstrukt ist der Vektor pTK+AP2/E (Gaubatz et al., 1995). Es enthält ein Luziferin-kodierendes Reportergen, dessen Expression unter Kontrolle eines artifiziellen E-Box-Promotors steht.

Um zu überprüfen, ob die Myc-vermittelte Transaktivierung dieses Reportergens durch die Überexpression von Med24 beeinflusst wird, wurde zunächst bestimmt, welche Menge Myc notwendig ist, um eine geringfügige, durch Kofaktoren steigerbare Aktivierung des Reporterkonstruktes zu erreichen. Hierzu wurden HeLa-Zellen neben einer konstanten Menge an Reporterplasmid sowie β -Gal-kodierendem Expressionsplasmid mit einer steigenden Menge von pcDNA3-Myc transfiziert. Die hieraus erhaltenen Lysate wurden in einem Luziferase-Assay (siehe 3.3.8) eingesetzt. Da in allen Ansätzen die gleiche Menge des β -Gal-kodierenden Expressionskonstruktes CMV- β -Gal transfiziert wurde, konnte die Aktivität der β -Galaktosidase in den Lysaten zur Normierung benutzt werden. Hierzu wurde parallel zu dem Luziferaseassay ein β -Gal-Assay wie unter 3.3.9 beschreiben durchgeführt.

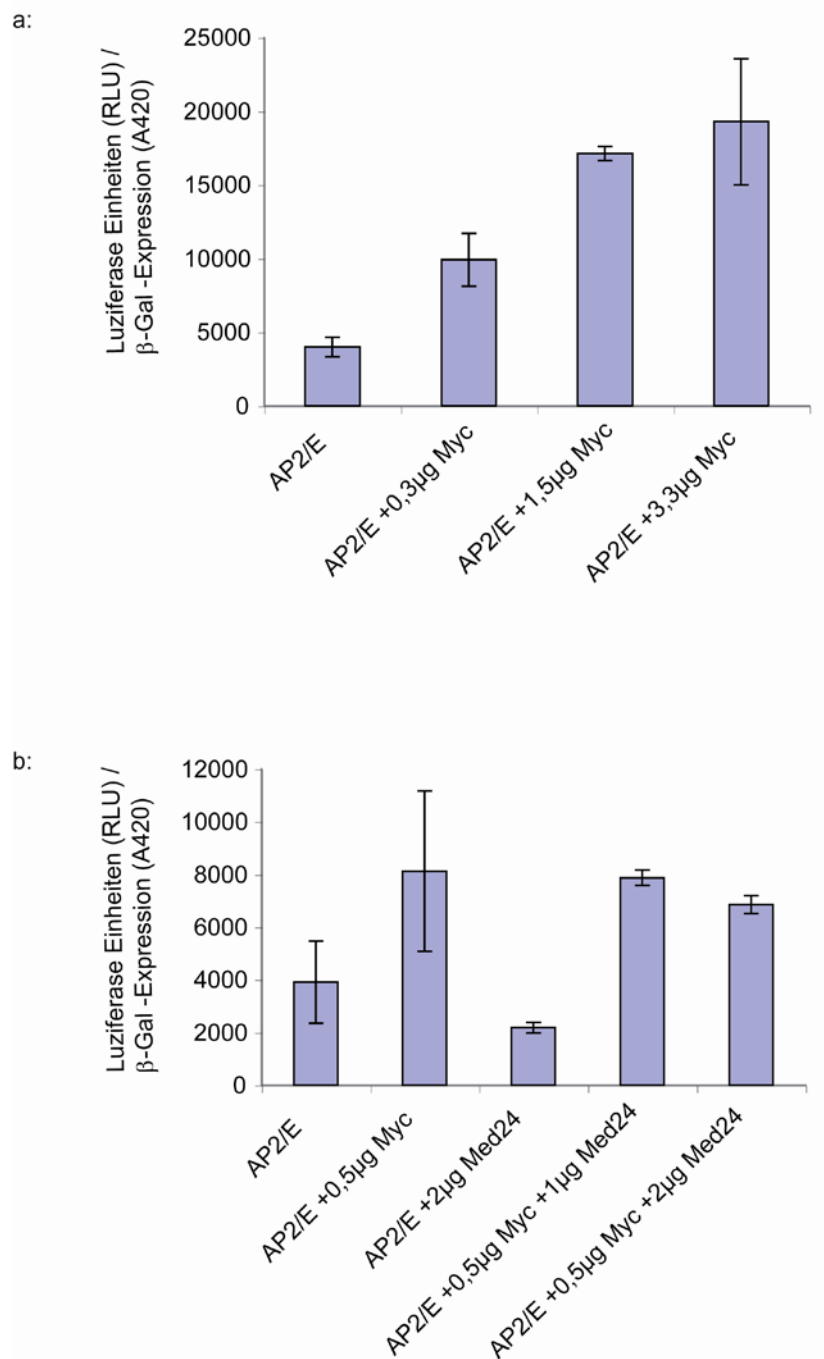


Abbildung 20: In transienten Transkriptionsassays in HeLa-Zellen lässt sich die Myc-abhängige Transaktivierung eines E-Box-Reporters nicht durch die Kotransfektion von Med24 steigern. Steigende Mengen an transfizierter c-Myc cDNA führt zu einer Aktivierung des Reporterkonstruktes AP2/E (a). Die Myc-abhängige Aktivierung des Reporterkonstruktes lässt sich durch Kotransfektion von Flag-Med24 nicht erhöhen (b).

Abb20a zeigt, dass sich proportional zur eingesetzten Menge von pcDNA3-Myc die Luziferase-Aktivität erhöht. Für die nachfolgenden Experimente wurden 0,5µg des Myc-Expressionsplasmides transfiziert. Med24 alleine war weder in der Lage, das Reportergen zu aktivieren noch die Myc-abhängige Transaktivierung des Reporters zu erhöhen (Abb.20b).

4.2.6 *In vivo* Rekrutierung des Mediatorkomplexes zu Myc-Zielgenen

In Maus-Zellen, die ein aktivierbares Myc-ER-Konstrukt exprimieren, konnte eine Myc-abhängige Rekrutierung der Mediator-Untereinheit Med1/Trap220 an den *CYCD2*-Promotor nachgewiesen werden (Bouchard et al., 2004). Um zu testen, ob der Mediatorkomplex in den oben beschriebenen humanen P493-6-Zellen nach Myc-Induktion zu Myc-aktivierbaren bzw –reprimierbaren Zielgenen gezogen wird, wurden qChIP-Experimente durchgeführt (Abb.21). Med1/Trap220 war in den ChIP-Experimenten in P493-6-Zellen nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Bei der Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen die Untereinheit Med11 zeigte sich jedoch eine deutliche Myc-abhängige Rekrutierung zu der E-Box des *NCL*-Gens (Abb.21a), nicht jedoch zu dem Promotor von *c/EBPα* (Abb. 21b).

Der Mediator-Komplex wurde als Koaktivatorkomplex speziell für die RNA Polymerase II (RNAPII) beschrieben (Kim et al., 1994). Neben der RNAPII-vermittelten Transkription ist Myc jedoch auch an der Regulation der RNAPI und -III beteiligt. So ist Myc in der Lage, die E-Box-enthaltenden und als Tandem im Genom vorliegenden rRNA-Gene direkt zu aktivieren (Arabi et al., 2005; Grandori et al., 2005).

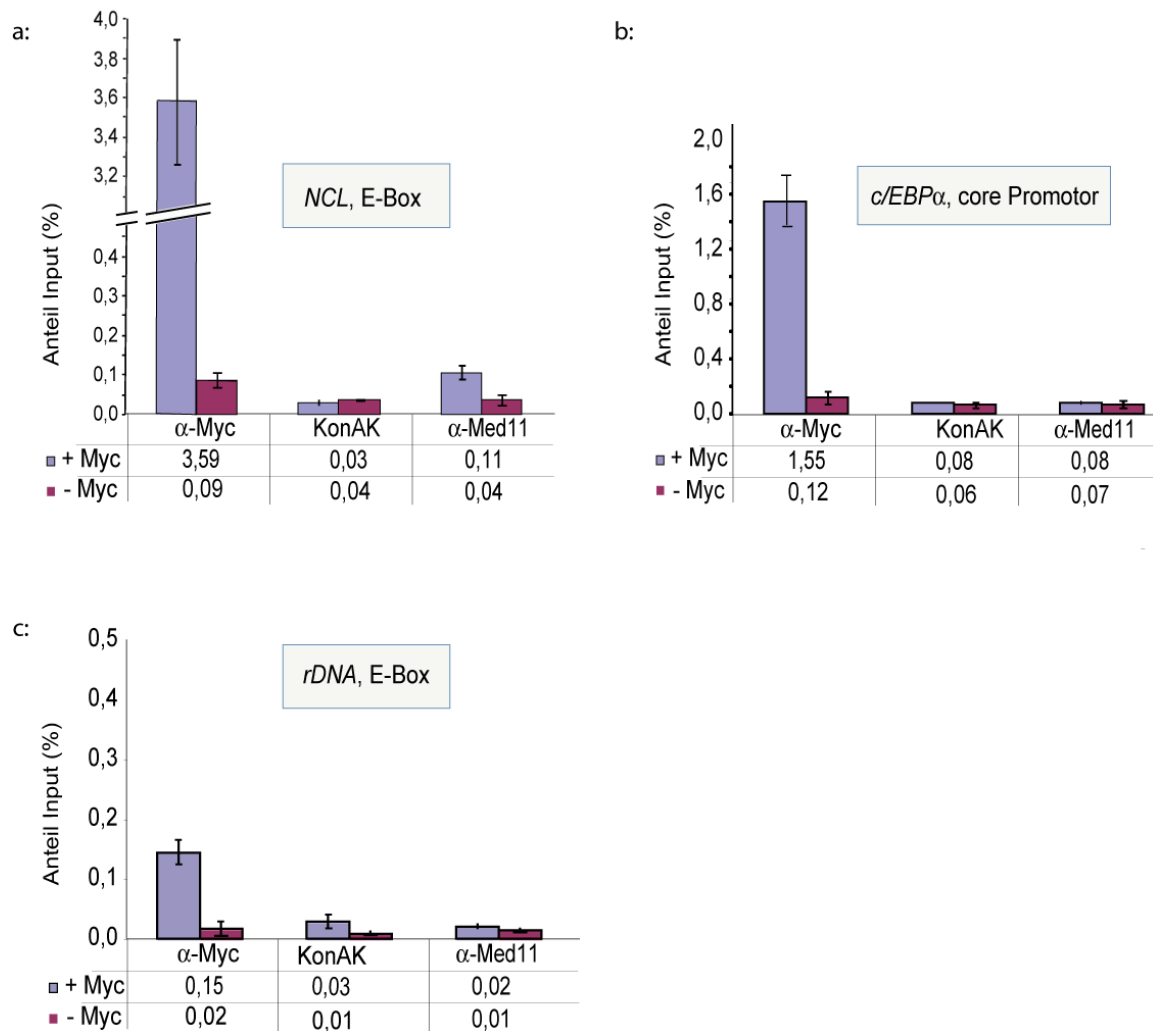


Abbildung 21: Der Mediator-Komplex wird zu dem Myc-aktivierten Zielgen *Nucleolin* (*NCL*), nicht aber zu dem reprimierten Zielgen *c/EBPα* oder dem Myc-aktivierbaren, RNAPI-transkribierten rRNA-Genen (*rDNA*) rekrutiert. Dargestellt ist das Ergebnis eines qChIP-Experiments, bei dem Chromatin aus P493-6-Zellen nach 0h und 8h Tet-Entzug mit Antikörpern gegen Myc als Positivkontrolle, Gadd45 als Negativ-Kontrolle (Kon-AK) und Med11 als Untereinheit des Mediators immunpräzipitiert wurde. Das Präzipitat wurde in eine Triplikat-qPCR eingesetzt, bei der die angezeigten Myc-Bindestellen amplifiziert wurden.

Wie Abb.21c zeigt konnte eine geringe Tet-induzierbare Bindung von Myc an die Promotorregion der rRNA-Genen nachgewiesen werden, jedoch keine Rekrutierung der Mediator-Untereinheit Med11. Somit übt Myc in diesen Zellen an den RNAPI-transkribierten rRNA-kodierenden Genen vermutlich einen Mediator-unabhängigen Aktivierungsmechanismus aus.

4.2.7 Cdk8 wird nicht zum Myc-reprimierten Zielgen *c/EBP α* rekrutiert

Die gegenüber anderen Untereinheiten relativ schwache Anreicherung von Cdk8 in den GST-Pulldownexperimenten (Abb.13) deutet darauf hin, dass Myc bevorzugt mit der aktiven Form des Mediator-Komplexes interagiert. Hierzu konsistent wurde eine Myc-abhängige Rekrutierung der Mediator-Untereinheit Med11 nur zu dem Myc-aktivierten Zielgen *NCL* gefunden (Abb.21). Um zu überprüfen, ob Cdk8 als fakultative Untereinheit des inaktiven oder repressiven Mediator-Komplexes *in vivo* zu Myc-reprimierten Zielgenen gezogen wird, wurden ChIP-Experimente mit einem Antikörper gegen Cdk8 durchgeführt (Abb.22). Eine Myc-abhängige Anreicherung zeigte sich bei keiner der getesteten Myc-Bindestellen, was darauf hindeutet, dass Myc mit dem aktiven, koaktivierenden Komplex interagiert und diese Interaktion eine Rolle in der Myc-vermittelten Aktivierung von Zielgenen spielt.

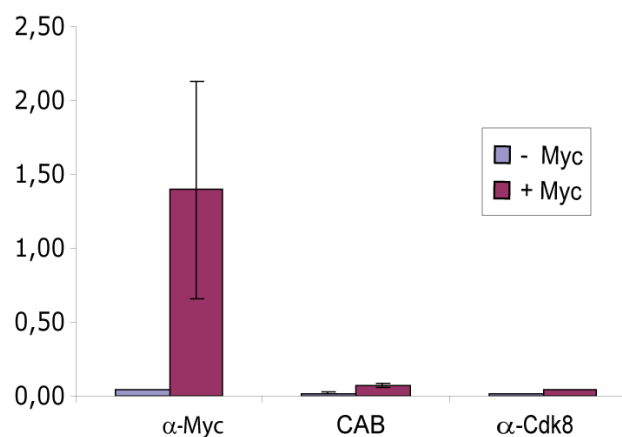


Abbildung 22: Cdk8, eine Untereinheit des inaktiven Mediator-Komplexes, lässt sich nicht am reprimierten Zielgen *c/EBP α* nachweisen. Dargestellt ist das Ergebnis eines qChIP-Experiments, bei dem Chromatin aus P493-6-Zellen nach 0h und 8h Tet-Entzug mit Antikörpern gegen Myc als Positivkontrolle, Gadd45 als Negativ-Kontrolle (CAB) und Cdk8 als Untereinheit des Mediators immunpräzipitiert wurde. Das Präzipitat wurde in eine Triplikat-qPCR eingesetzt, bei der die Myc-Bindestelle des *c/EBP α* -Gens amplifiziert wurde.

4.2.8 Short-hairpin-vermittelter Gen-knockdown führt zu einer deutlichen Reduktion an Med24 RNA in HeLa-Zellen

Um die Bedeutung des Mediatorkomplexes für die Funktionen von Myc zu untersuchen, wurde Med24 als Myc-interagierende Untereinheit des Mediatorkomplexes mit Hilfe von short-hairpin-RNA (shRNA)-vermittelter Gensuppression (knockdown) in HeLa-Zellen depletiert

Über retrovirale Infektionen wurden pRetrosuper-Med24 bzw. pRetrosuper-Scramble (Scr) als Negativkontrolle in die Zellen eingebracht. Diese Plasmide kodieren neben den shRNAs zusätzlich eine Puromycin-Resistenz, nicht-infizierte Zellen konnten somit durch Puroselektion innerhalb von 24-36h eliminiert werden. Der infizierte HeLa-Zellpool (shMed24 bzw. shScr) wurde 72-80h nach der Infektion für weitere Analysen geerntet. Abb.23 zeigt die Quantifizierung des knockdowns in einer RT-PCR. Hierzu wurde aus den Zellen RNA präpariert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde in einer qPCR die relative Menge an spezifischen Transkripten bestimmt. Es wurde eine Med24-PCR sowie zur Normierung eine PCR von dem Haushaltsgen S14 durchgeführt.

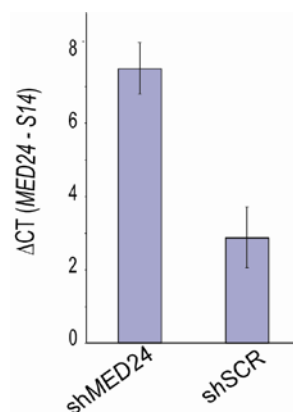


Abbildung 23: qRT-PCR zur Darstellung des Med24-knockdowns in den shMed24-Zellen. Aus shMed24 und shScr-Zellen wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In Triplikat-qPCRs wurde sowohl Med24 cDNA sowie S14-cDNA zur Normierung amplifiziert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Ct-Werte normiert auf den Ct-Mittelwert der S14-PCR.

Man erkennt, dass die (auf S14-normierte) Menge an Med24 in den shMed24-Zellen gegenüber der shScr-Kontrolle spezifisch reduziert war. Der Unterschied zwischen shMed24 und shScr betrug ca. 4 Ct-Werte, d.h. die Med24-PCR benötigte in der Med24-knockdown-Probe gegenüber der Scramble-infizierten Probe ungefähr 4 Zyklen mehr, um eine festgelegte Menge an Med24 zu amplifizieren. Wenn man davon ausgeht, dass sich die Menge an Amplifikat innerhalb eines Zyklusses der PCR verdoppelt, kann man schließen, dass durch die Infektion mit shMed24 die Menge an Med24 mRNA innerhalb der Zelle um den Faktor 16 gegenüber der Scr-Kontrolle verringert wurde.

Eine Depletion von Med24 auf Proteinebene konnte nicht nachgewiesen werden, da zu dieser Zeit kein Antikörper gegen Med24 zur Verfügung stand, der endogenes Med24 detektierte.

4.2.9 knockdown von Med24 führt zur Herunterregulation zahlreicher Myc-Zielgene

Die unter 4.2.8 beschriebenen RNA-Proben aus pRetrosuper-Med24 bzw. pRetrosuper-Scr – infizierten Zellen (shMed24 und shScr) wurden in cDNA umgeschrieben, indirekt mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 markiert in ein cDNA-Microarray-Experiment eingesetzt (durchgeführt von der Microarray-Einheit des IMT). Hierzu wurden 4 identische, jeweils mit 11552 cDNA-bestückte Microarray-slides eingesetzt und eine *Flip-Colour-Sandwich*-Hybridisierung durchgeführt. Die hieraus resultierenden, 4 Datensätze wurden gemittelt.

Das Expressionsprofil der Med24-knockdown Zellen (shMed24) im Vergleich zu den Kontroll-Zellen (shScr) ist in Abb.24 graphisch als MA-Plot dargestellt (von Birgit Samans erstellt). Unterschiede im Expressionsniveau einzelner Gene zwischen shMed24 und shScr stellen sich als positive Abweichungen (Hochregulierung in den shMed24-Zellen) bzw. negative Abweichungen (Herunterregulierung in den shMed24-Zellen) von der Null-Linie auf der Y-

Achse des Diagramms dar. Die X-Achse zeigt die absolute Intensität des Fluoreszenzsignals einzelner cDNA-Klone. Die Myc-Zielgene (annotiert in der Datenbank www.myc-cancer-genes.org) sind hierbei in rot hervorgehoben.

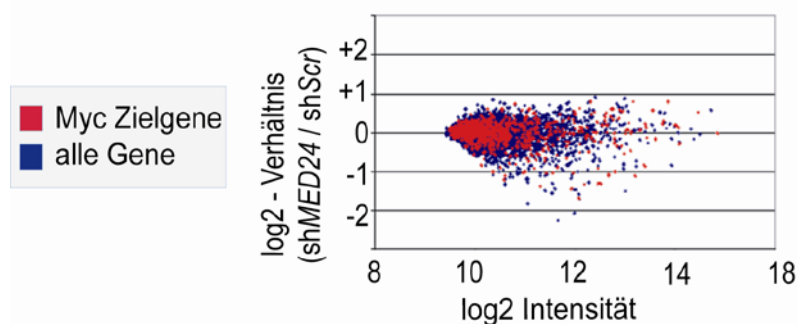


Abbildung 24: cDNA-Microarray-Experiment zum Vergleich der Expressionsmuster zwischen shMed24 und shScr-Zellen. Gesamt-RNA aus shMed24 bzw. shScr-Zellen wurde in cDNA umgeschrieben, indirekt fluoreszenzmarkiert und als *flip-colour-Sandwich*-Hybridisierung in einem Microarray-Experiment eingesetzt. Die resultierten Datensätze wurden gemittelt und als MA-Plot dargestellt, wobei jeder Punkt im Diagramm einem cDNA-Klon auf den *Microarray-slide* entspricht.

Man erkennt, dass die große Mehrheit aller 11552 Gene, die auf dem Array vorhanden waren, in den shMed24 gegenüber shScr nicht dereguliert war. Von den 11552 Genen, die auf dem Microarray vertreten waren wiesen 342 Gene eine Deregulation ≥ 2 -fach auf. Innerhalb der Gruppe von deregulierten Genen waren fast alle Gene in den Med24-knockdown-Zellen gegenüber der Scr-Kontrolle geringer exprimiert ($\log_2 \text{shMed24/shScr} < 0$), was Med24 eine Rolle in der Aktivierung dieser Gene zuweist. Außerdem waren Myc-Zielgene innerhalb dieser Gruppe stark angereichert (siehe Tabelle 3), was auf eine Funktion in der Myc-vermittelten Genaktivierung hindeutet.

Zum statistischen Nachweis der Anreicherung von Myc-Zielgenen innerhalb der Gruppe der durch shMed24-regulierten Gene wurde in einem χ^2 -Test (χ^2 -Unabhängigkeitstest) durchgeführt (von Birgit Samans durchgeführt). Der χ^2 -Test ist ein nicht-parametrischer Anpassungstest, der zur Überprüfung von Häufigkeitsverteilungen eingesetzt wird. Aus dem Merkmal Myc-Zielgen bzw. Nicht-Myc-Zielgen in der Gruppe $>0,5$ dereguliert bzw. der Gesamtheit

aller Gene werden vier Teilgruppen generiert, für die man die beobachteten Häufigkeiten in eine Kreuztabelle einträgt. Dann wird die Häufigkeit bestimmt, die zu erwarten wäre, wenn die beiden Merkmale völlig unabhängig voneinander wären und mit der beobachteten Häufigkeitsverteilung verglichen.

Der χ^2 -Test ergab einen p-Wert <0.01 , somit liegt eine hoch-signifikante Anreicherung von Myc-Zielgenen innerhalb der Gruppe der durch shMed24-deregulierten Gene vor.

	Anzahl Gene	Myc Zielgene (%)
total	11552	10
Deregulation		
≥ 2-fach	342	20
≥ 3-fach	65	25
≥ 4-fach	22	41

Tabelle 3: Annotierte Myc-Zielgene sind in den Med24-knockdown-Zellen innerhalb der Gruppe von deregulierten Genen stark angereicht.

Eine Auswahl von annotierten Myc-Zielgenen und deren Deregulation in den shMed24 gegenüber shScr-Kontrollzellen zeigt Tabelle 4.

Auswahl an Myc Zielgenen	Deregulation (fach)
<i>MTHFD1</i>	-6,6
<i>PAI-RBP1</i>	-5,6
<i>APP</i>	-4,9
<i>EIF4A1</i>	-4,6
<i>SCD</i>	-3,8
<i>NCL</i>	-3,3

Tabelle 4: Deregulation potentieller Myc-Zielgene nach knockdown von MED24 in HeLa-Zellen.

Die Deregulation der Myc-Zielgene konnte ebenfalls in einer RT-PCR mit anschließender qPCR nachgewiesen werden (Abb.25). Um Unterschiede in der eingesetzten RNA-Menge als Ursache für unterschiedliche Expressionslevel auszuschließen, wurde zunächst eine qPCR auf ein housekeeping-Gen $\beta 2$ -MIKROGLOBULIN (B2M) in Triplikaten durchgeführt. Die dargestellten Werte sind die Differenzen zwischen den Ct-Werten der untersuchten Gene (Mittelwert aus triplikat PCRs) und dem Mittelwert der B2M-PCR.

Man findet MED24 (a) sowie die untersuchten Myc-Zielgene, die in dem Microarray-Experiment in den shMed24-Zellen (shMed24) herunterreguliert waren, auch in der RT-PCR gegenüber der shScramble-Probe spezifisch herunterreguliert (b-e). Die Expression des Myc-Zielgens Cyclin D2 (CYCD2) zeigte hier (wie auch in dem Microarray-Experiment) keine Deregulation in den shMed24-Zellen (f).

Um auszuschließen, dass die niedrige Expression der Myc-Zielgene in den Med24-knockdown Zellen eine indirekte Folge einer geringeren Myc-Expression ist, wurde die Myc-Expression in den shMed24-Zellen gegenüber den shScr-Zellen bestimmt (g). Es zeigte sich, dass im Gegensatz zu zahlreichen Myc-Zielgenen die MYC-Expression in den Med24-knockdown Zellen sogar erhöht war. Die Deregulation der MYC-Zielgene geht somit nicht auf eine niedrige Expression von Myc zurück.

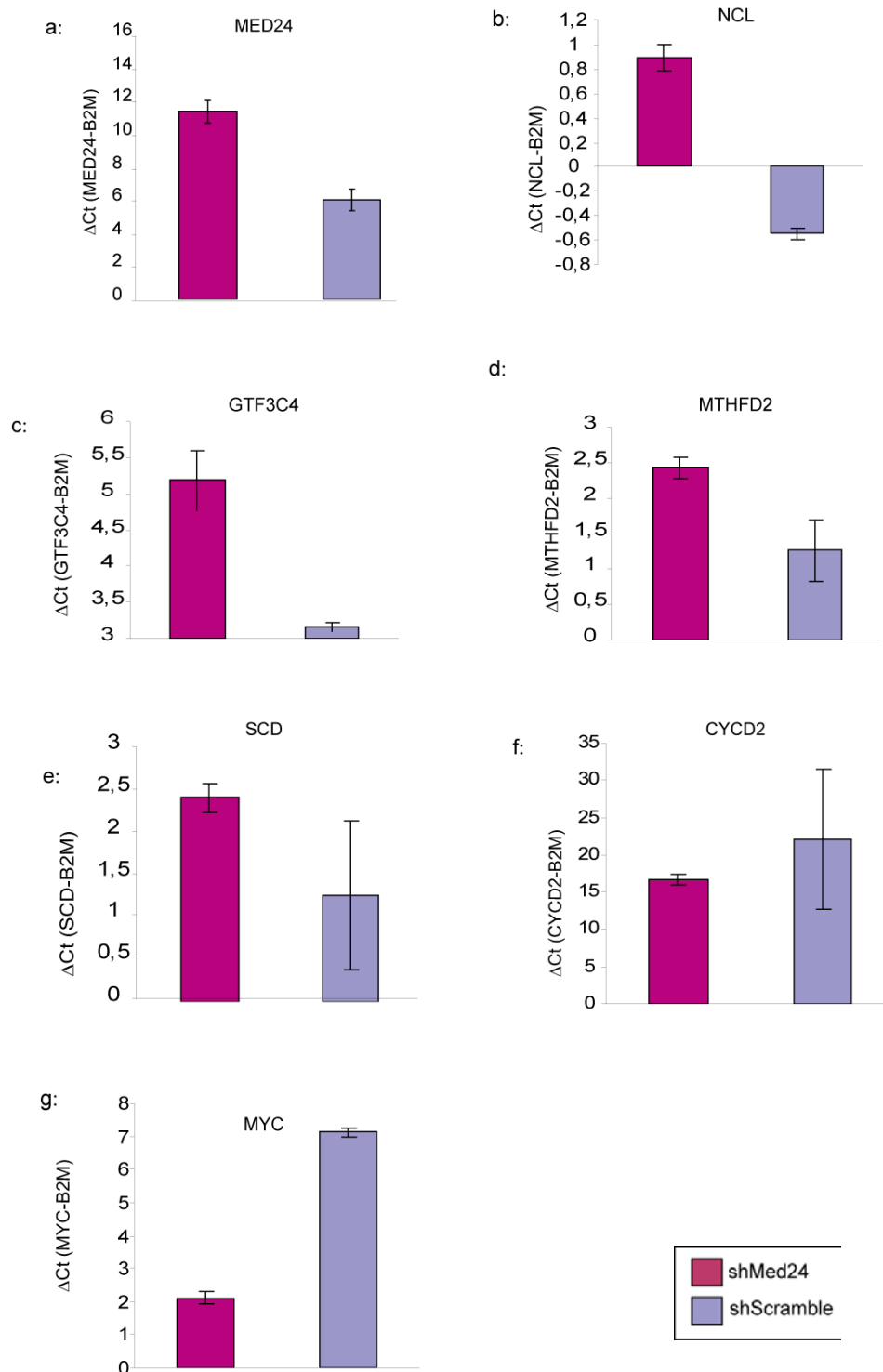


Abbildung 25: Geringere Expression von Myc-Zielgenen in den shMed24-Zellen gegenüber den shScr-Zellen in einer qRT-PCR. Aus shMed24 und shScramble-Zellen wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In Triplikat-qPCRs wurden die angezeigten cDNA amplifiziert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Ct-Werte normiert auf den Ct-Mittelwert einer β -2-Mikroglobulin (B2M) aus drei unabhängigen PCR-Proben.

5 Diskussion

5.1 Myc-abhängige Transkriptionsmechanismen

5.1.1 Das Zellsystem P493-6 ermöglicht die Validierung von direkten Myc-Zielgenen

Die hier vorgestellten Chromatinimmunpräzipitationen (ChIPs) zur Untersuchung von Myc-abhängigen Transkriptionsmechanismen wurden in einem Zellsystem (P493-6-Zellen) durchgeführt, in dem ein stark exprimiertes, exogenes *MYC*-Allel unter der Kontrolle eines Tet-Repressors steht. Die starke Regulierbarkeit des exogenen Myc-Allels spiegelt sich in den ChIP-Experimenten in einer deutlich induzierbaren Besetzung des Transkriptionsfaktors Myc an bekannten Zielgenen wie Nucleolin, Cyclin D2 und *c/EBP α* wieder (Abb.6). So konnte nach Myc-Induktion eine 20 bis 30-fache Menge an genomischen Myc-Bindestellen gegenüber der uninduzierten Probe präzipitiert werden. Der Anteil präzipitierter Myc-Bindestellen betrug nach Myc-Überexpression bis zu 3 % vom Input. Dieser Wert ist relativ hoch für Chromatinimmunpräzipitationen und ist vergleichbar mit den ChIP-Experimenten in P493-6-Zellen von Frank und Koautoren (2003).

Die starke Expression des exogenen Myc-Allels übersteigt eine physiologische, z.B. serum-stimulierte Myc-Expression deutlich, und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass unter diesen Bedingungen genomische Loci von Myc besetzt werden, welche bei einem physiologischen Expressionsniveau keine Bindestellen darstellen. Da die Expression in Myc-transformierten Zellen jedoch in der Regel stark dereguliert ist, handelt es sich hierbei möglicherweise um "pathologischen Bindestellen", welche bei der Myc-induzierten Tumorigenese von Bedeutung sind. Hierbei handelt es sich entweder um genomische Bindestellen, die geringfügig von der E-Box-*consensus*-Sequenz CACGTG abweichen, oder die Bindung von Myc erfolgt über andere Transkriptionsfaktoren wie TBP (Hateboer et al., 1993). Fernandez und Koautoren (2003) unterscheiden ebenfalls zwischen hoch- und niedrig-affinen Myc-Bindestellen. Die sehr starke Expression von Myc in P493-6 Zellen bedingt eine deutliche Myc-Besetzung auch an niedrig-affinen

Bindestellen bzw. die Besetzung von E-Boxen, die in anderen getesteten Zellsystemen (U.937 und HL60) nicht durch Myc besetzt waren. In der Regel zeigte sich jedoch, dass die Myc-Besetzung verschiedener Promotoren in ihrer Stärke charakteristisch und zwischen verschiedenen Zellsystemen vergleichbar ist. Die hoch-affinen E-Boxen lokalisieren häufig in oder in der Nähe von CpG-Inseln.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei jedem der untersuchten genomischen Abschnitte eine gewisse Zunahme der Myc-Bindung nach Überexpression des Myc-Allels. Selbst der als Negativ-Kontrolle verwendete genomische Abschnitt aus dem transkribierten Bereich des Nucleolin-Gens (ca. 10kb *downstream* der E-Box) ließ sich durch Anschalten des Myc-Allels geringfügig anreichern (Abb.6). Diese Anreicherung war jedoch im Vergleich zu der Anreicherung bekannter Myc-Zielgene wie dem E-Box-Bereich des Nucleolin-Gens (*NCL*, E-Box) deutlich geringer.

Die induzierbare Anreicherung der genomischen Loci nach Myc-Induktion in ChIP-Experimenten wurde bereits in früheren Studien als strenges Kriterium für direkte Myc-Zielgene herangezogen (Guccione et al., 2007; Fernandez et al., 2003). Auch mit den hier gezeigten ChIP-Experimenten konnten im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bornkamm eine Gruppe neuer Myc-Zielgene validiert werden. Es handelt sich um Gene im Zusammenhang mit der Interferon-Antwort (Stat1, IRF7, IFN β). Sie werden negativ durch c-Myc reguliert, wobei sich vor allem Stat1 als ein, stark von Myc gebundenes, direktes Zielgen herausstellte (Schlee et al., 2007).

Neben der Validierung direkter Zielgene eignet sich das Zellsystem gut für Untersuchungen von Myc-abhängigen Transkriptionsmechanismen wie Kofaktorrekruitierungen, Histonmodifikationen oder CTD-Phosphorylierungen des RNAPII-Komplexes durch ChIP-Experimente (Frank et al., 2003). Der Nachweis von indirekt und häufig transient an die DNA-bindenden Kofaktoren ist durch eine i.d.R. sehr niedrige crosslinking-Rate in den ChIP-Experimenten erschwert (Kurdistani und Grunstein, 2003). Hierbei stellt die starke Induzierbarkeit von Myc in den P493-6-Zellen einen Vorteil gegenüber anderen Zellsystemen mit geringeren Expressionsunterschieden dar, weil

durch die sehr starke Induzierbarkeit der genomischen Myc-Bindung auch bei niedrigen crosslinking-Raten Kofaktoren nachgewiesen werden können.

5.1.2 Myc verfügt über verschiedene Mechanismen zur transkriptionellen Regulation

Myc bedient sich verschiedener Mechanismen bei der Ausübung seiner transkriptionellen Aktivitäten. Zum einen wirkt der Transkriptionsfaktor sowohl als Aktivator als auch als Repressor. Die N-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD) mit ihren hoch-konservierten Myc-Boxen ist für nahezu alle biologischen Funktionen essentiell. Doch durch die Verwendung verschiedener Deletions- und Punktmutationen innerhalb der TAD konnte gezeigt werden, dass sich die biologischen Funktionen von Myc zum Teil voneinander trennen lassen und somit auf verschiedenen Mechanismen beruhen (Oster et al., 2003).

Der am besten untersuchte Mechanismus von Myc ist die MB2-abhängige Transaktivierung von Zielgenen. Zu einem Teil von Zielgenen werden HAT-Komplexe über die MB2 rekrutiert, welche lokal die Acetylierung der Histone im Bereich der Myc-Bindestellen katalysieren (Bouchard et al., 2001; Frank et al., 2001). Ein weiterer Teil von Myc-Zielgenen (ca. 20%) wird unter Beteiligung der Kinase Pim1, welche Histon H3 an Serin10 phosphoryliert, aktiviert (Zippo et al., 2007).

Bei der Repression von Myc-Zielgenen lassen sich durch die Verwendung verschiedener Myc-Allele Mechanismen an INR-positiven und INR-negativen Genen voneinander trennen (Oster et al., 2003). Die Repression erfolgt zwar vermutlich in allen Fällen über Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren, es wurde jedoch in vielen Fällen eine Beteiligung der MB2 beschrieben. Eine ungeklärte Frage hierbei war, welche Kofaktoren für die Repression benötigt werden.

5.1.3 Myc rekrutiert die MB2-abhängigen Kofaktoren sowohl zu dem aktivierten als auch reprimierten Zielgen

Für den Vergleich von Kofaktorrekruitierungen an aktivierten und reprimierten Zielgenen wurden die Myc-Zielgene Nukleolin (*NCL*) und *c/EBP α* gewählt, da sie nach Myc-Induktion in P493-6-Zellen entsprechend der Erwartungen reguliert (Abb.5) und gleichermaßen stark von Myc gebunden wurden (Abb.6).

Das Myc-Zielgen Nukleolin ist ein nukleoläres Phospho-Protein, das eine Rolle in der transkriptionellen Kontrolle von rRNA-Genen, der rRNA-Reifung sowie im nukleoplasmatischen Transport von ribosomalen Komponenten spielt (Srivastava et al., 1989). Das humane Gen lokalisiert auf dem genomischen Abschnitt 2q12 und besteht aus 14 Exons und 13 Introns, die eine Länge von ca. 11 kb umfassen. Man findet die Myc-Bindestelle (E-Box) im ersten Intron. Das humane *c/EBP α* -Gen findet man im genomischen Abschnitt 19q13.1. *c/EBP α* (CCAAT/enhancer-binding protein alpha) wird z.B. in differenzierten Adipozyten exprimiert. Durch die Repression von *cEBP α* kann Myc die Differenzierung der Adipoblastenzelllinie 3T3-L1 hemmen (Freytag und Geddes, 1992). Das Gen trägt ein INR-Element im core-Promotor, dessen Repression von der MB2 abhängt (Li et al., 1994).

Parallel zu den hier dargestellten Untersuchungen zur Rekrutierung von Myc-Kofaktoren wurde eine Studie veröffentlicht, in der in P493-6-Zellen eine Rekrutierung des Tip60-Komplexes zu aktivierten Zielgenen gezeigt wird (Frank et al., 2003). Zu dieser Zeit war jedoch noch ungeklärt, ob diese Myc-Kofaktoren auch zu Myc-reprimierten Zielgenen rekrutiert werden. Abb.7 zeigt, dass die MB2-abhängigen Kofaktoren (Trrap, Tip48/Tip49 und Tip60) gleichermaßen zu dem aktivierten und reprimierten Zielgen rekrutiert werden. Außerdem konnte an beiden genomischen Bindestellen Myc-induzierte Histonacetylierung bei unveränderter Nukleosomendichte (siehe Abb.9) nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass Myc an beide Zielgene einen in Bezug auf die HAT-Aktivität funktionellen Tip60-Komplex rekrutiert. Unklar ist, ob die Tip60-vermittelte Acetylierung des Myc-reprimierten Locus (*c/EBP α*) für die Repression essentiell ist. Diese Frage könnte evtl. geklärt

werden, indem man Komponenten des Tip60-Komplexes durch RNA-Interferenz depletiert und die Repressionsfunktion von Myc untersucht.

Bisher wurde Histon-Acetylierung v.a. mit Genaktivierung in Zusammenhang gebracht. Die Acetylierung der Histone bewirkt eine Dekomprimierung des Chromatins, wodurch die Zugänglichkeit für regulatorische Faktoren oder für Komponenten des basalen Transkriptionsapparates erhöht wird. Im Falle des Myc-reprimierten Zielgens könnte die Zugänglichkeit des Promotors für einen Repressor die Expression des Gens verringern.

Neben Tip60 wurden die MB2-abhängigen Kofaktoren Tip48/Tip49 (es wurde ein bispezifischer Antikörper verwendet) Myc-abhängig zu den untersuchten genomischen Bindestellen rekrutiert (Abb.7). Der Effekt ist zwar klein, ließ sich aber mehrfach beobachten. Ungefähr zeitgleich wurde eine Studie in *Xenopus*-Embryonen veröffentlicht, in der gezeigt werden konnte, dass Tip48 (Reptin) und Tip49 (Pontin) synergistisch und proliferationsfördernd wirken und eine entscheidende Rolle bei der Myc-vermittelten Repression spielen (Etard et al., 2005). In *Drosophila* ist der Zusammenhang zwischen Reptin, Pontin und Myc weniger eindeutig als in *Xenopus*. Während bestimmte Mutationen der ATPasen/Helikasen zwar eine genetische Wechselwirkung mit Myc-Mutationen aufweisen, zeigen die deregulierten Zielgene in diesen Mutanten wenig Überlappung (Bellosta et al., 2005).

Eine Myc-abhängige Bindung von Tip48 und Tip49 an eine Promotorregion, an die der Myc/Miz-1-Komplex bindet (biotinyliertes Oligonukleotid, p21-Promotor) konnte *in vitro* nicht nachgewiesen werden, die Kofaktoren banden an das Oligonukleotid unabhängig von Myc (Abb.8). Ebenfalls konnte kein Einfluss von Tip48 oder Tip49 auf die Myc-vermittelte Repression in transienten Reporterassays nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass in transienten Transkriptionsassays die DNA ektopisch vorliegt und nicht in Chromatin verpackt ist. Möglicherweise gibt es einen Repressionsmechanismus, bei dem Tip48 und Tip49 eine Rolle spielen, der jedoch von einer Verpackung der DNA in Chromatin abhängt. Ein hilfreiches System zur Klärung dieser Frage könnte ein stabil in das Genom integriertes Reporterplasmid darstellen.

5.1.4 Myc induziert CTD-Phosphorylierung an Rbp1, der großen Untereinheit des RNAPII-Komplexes

Ein Teil der Myc-aktivierten Zielgene werden MB2-unabhängig reguliert (Nikiforov et al., 2002, Zhang et al., 2006). Ein MB2-unabhängiger Mechanismus wurde für das Zielgen Cad beschrieben, bei dem die Rekrutierung von P-TEFb die transkriptionelle Elongation stimuliert. P-TEFb verfügt über eine Kinaseaktivität (Cdk9/CycT1), welche Serin2 phosphoryliert. An diesem Zielgen konnte keine Erhöhung der lokalen Histon-Acetylierung durch Myc induziert werden. In einer vor kurzem veröffentlichten Studie von Cowling und Koautoren wurde ein Aktivität der Transaktivierungsdomäne von Myc beschrieben, die zur CTD-Phosphorylierung der RNAPII führt und unabhängig von dem C-Terminus von Myc ist (Cowling et al., 2007).

In den P493-6-Zellen konnte keine Myc-induzierte Serin2-Phosphorylierung, jedoch eine deutliche Serin5-Phosphorylierung nachgewiesen werden (Abb.10). Ein möglicher Zusammenhang zwischen Myc und Serin5-Phosphorylierung ergab sich bereits bei einer früheren Studie aus unserem Labor, in der gezeigt wurde, dass die Aktivierung von Myc-ER in Mauszellen die Bindung von TFII-H an CycD2 erhöht (Bouchard et al., 2004). TFII-H verfügt über eine Kinaseaktivität (Cdk7/CycH), welche Serin 5 phosphoryliert. In dem hier verwendeten Zellsystem konnte jedoch keine TFII-H-Rekrutierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Neben Cdk7 wurde die Mediatoruntereinheit Cdk8 als Serin5-Kinase beschrieben. Zwar konnte in der vorliegenden Arbeit eine Interaktion zwischen Myc und dem Mediatorkomplex nachgewiesen werden, es zeigte sich jedoch, dass Myc präferentiell mit dem aktiven Mediatorkomplex interagiert, welcher kein Cdk8 enthält. Somit ist unklar, welche Kinase für die beobachtete, Myc-induzierte CTD-Phosphorylierung verantwortlich ist. Ebenfalls unklar ist, welche biologische Relevanz die Modifikation hat, welche sowohl am aktivierten als auch am reprimierten Zielgen beobachtet werden konnte.

5.1.5 p300 wird differentiell zu dem aktivierten Zielgen rekrutiert

p300 ist ein transkriptioneller Koaktivator, der Histone (präferenziell Histon H3 und H4) sowie Nicht-Histonproteine (z.B. p53, E2F) acetylieren kann. p300 und das sehr ähnliche CBP interagieren mit Myc MB2-unabhängig über den C-Terminus von Myc und wirkt in transienten Transkriptionsassays als positiver Kofaktor von Myc (Vervoorts et al., 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass p300 *in vitro* c-Myc acetyliert und einen negativen Effekt auf die Proteinstabilität von Myc ausübt. (Vervoorts et al., 2003).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie aus unserem Labor wurde gezeigt, dass die Ubiquitylierung spezifischer Lysine innerhalb des Myc-Proteins durch HectH9 eine Voraussetzung für die Bindung von p300 an Myc ist (Adhikary et al., 2005), und dass die Gegenwart von Miz-1 (an den Bindestellen Myc-reprimierter Zielgene) die Ubiquitylierung von Myc hemmt. In Einklang mit diesen Ergebnissen konnte in den hier präsentierten ChIP-Experimenten in P493-6-Zellen eine differentielle Rekrutierung von p300 nur am Nukleolin-, nicht aber am *c/EBP α* -Gen nachweisen werden (Abb.11). Diese Ergebnisse sind in die Publikation Adhikary et al., 2005 eingegangen.

Der Wirkmechanismus von p300 für die Transaktivierung ist bisher unklar. Es konnte bisher nicht gezeigt werden, dass p300/CBP *core*-Histone *in vivo* acetylieren, und man vermutet, dass die HAT-Aktivität dieser Proteine keine Rolle für die Modifikation von Chromatin hat (Agalioti et al., 2002; Li et al., 1999). Die koaktivierende Aktivität von p300 auf die Transaktivierung von Myc in transienten Transkriptionsassays (Vervoorts et al., 2003) deutet ebenfalls darauf hin, dass es Wirkmechanismen von p300 unabhängig von einer intakten Chromatinstruktur gibt.

5.2 Interaktion zwischen Myc und dem Mediatorkomplex

In früheren Studien gab es bereits Hinweise auf eine Interaktion des Transkriptionsfaktors Myc mit dem Mediatorkomplex. So konnten Eberhardy und Farnham (2001) *in vitro* eine Interaktion zwischen Cdk8 und GST-getagtem N-Terminus von Myc (Aminosäure 1-52) zeigen. Diese Interaktion

erschien aus mehreren Gründen interessant: Erstens gab sie erstmals einen Hinweis darauf, dass Myc mit dem Mediatorkomplex interagiert. Zweitens erfolgte die Interaktion über den extremen N-Terminus von Myc, eine Region, die sich zwar in verschiedenen biologischen Assays als essentiell für Myc darstellte, Kofaktoren, die diese Region des Myc-Proteins binden, waren jedoch bis dahin unbekannt. Drittens wäre diese Interaktion MB2-unabhängig. Da ein Teil der Myc-Zielgene tatsächlich MB2-unabhängig aktiviert werden, könnte die Interaktion zwischen dem Mediator und Myc hierfür verantwortlich sein. Und schließlich wurde Cdk8 in zahlreichen Studien als transkriptioneller Repressor, und der Cdk8-positive Mediatorkomplex als inaktiv oder repressiv beschrieben. Die Interaktion zwischen Myc und dieser Form des Mediators könnte also an der Myc-vermittelten Transrepression von Zielgenen beteiligt sein.

In einer ChIP-Analyse mit Maus-Zellen, die ein OHT-induzierbares Myc-ER-Allel tragen konnte später eine *in-vivo*-Rekrutierung einer weiteren Mediator-Untereinheit (Med1/Trap200) zu dem Myc-aktivierten Zielgen *CycD2* gezeigt werden (Bouchard et al., 2004), was den oben beschriebenen Hinweis auf eine Interaktion zwischen Myc und dem Multiproteinkomplex erhärtet hat.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen dem Mediator und Myc detailliert untersucht. Um Aussagen darüber treffen zu können, welche Bedeutung die Interaktion für die Funktionen von Myc hat, war die Identifizierung der interagierenden Untereinheit(en) des Komplexes von entscheidender Bedeutung. Ziel war es, die Interaktionsfläche zwischen Myc und dem Mediator durch eine möglichst kleine Deletion im Myc-Protein zu zerstören, um im Vergleich zum Myc Wildtyp die Abhängigkeit verschiedener Myc-Funktionen von der Interaktion zum Mediator zu untersuchen.

Die Interaktion des Komplexes mit Myc konnte in unterschiedlichen Experimenten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt werden. Aus Kernextrakten ließen sich mit Hilfe eines GST-Myc (Aminosäuren 1 bis 163 mit N-terminalem GST) mehrere Untereinheiten des Mediatorkomplexes gegenüber GST alleine anreichern. Es wurde bewusst nur die N-terminale Transaktivierungsdomäne von Myc für diesen Versuch verwendet, da der C-

Terminus von Myc stark zu unspezifischen Interaktionen mit Proteinen neigt. Interessanterweise ließen sich die obligaten Untereinheiten Med11/HSPC296 und Med14/RGR1 deutlich besser aufreinigen als die fakultative Untereinheit Cdk8 (siehe Abb.13), ein Hinweis, dass Myc präferentiell mit der aktiven, koaktivierenden Form des Mediators interagiert und die Interaktion somit v.a. für die Myc-vermittelte Transaktivierung von Bedeutung wäre. In einer Chromatinimmunpräzipitation in P493-6 Zellen ließen sich entsprechend, nach Myc-Induktion und Verwendung eines Cdk8-Antikörpers, keine genomischen Bindestellen von Myc im Präzipitat anreichern (Abb.22).

Die bevorzugte Bindung einer der beiden Mediatorformen wurde auch schon bei anderen Transkriptionsfaktoren beschrieben. So interagiert z.B. die phosphorylierte, aktive Form von c/EBP β mit dem Cdk-8-freien Mediatorkomplex, während die unphosphorylierte Form mit dem großen Komplex interagiert (Mo et al., 2004).

5.2.1 Zahlreiche Untereinheiten eines Moduls des Mediatorkomplexes interagieren *in vitro* mit c-Myc

Aus der Interaktionsstudie der einzelnen Mediatoruntereinheiten mit GST-Myc (Abb.14) ging eine geringe Anzahl von Proteinen hervor, welche *in vitro* eine im Vergleich zu GST starke, MB2-unabhängige Bindung zeigten. Es handelt sich um Med14/RGR1, Med15/Arc105, Med17/Trap80, Med23/Sur2 und Med24/Trap100. Von diesen fünf gefundenen Untereinheiten lokalisieren vier (Med14, Med15, Med23 und Med24) innerhalb des Schwanz-Moduls des Mediatorkomplexes, welches für zahlreiche Interaktionen mit Aktivatoren in Zusammenhang gebracht wurde (Abb.1 und Tabelle 2). Bis auf Med16, welches in dem IVT-GST-Pulldown nicht getestet wurde, waren somit alle beschriebenen Untereinheiten des Schwanzmoduls in Bezug auf eine Myc-Bindung positiv. Da der größte Teil aller *in vitro* translatierten Proteine jedoch keine Bindung zu GST-Myc zeigte, kann man davon ausgehen, dass es sich hierbei um Proteine mit hoher Affinität zu Myc handelt.

5.2.2 Myc interagiert *in vivo* mit der Mediator-Untereinheit Med24

Die im IVT-GST-Pulldown deutlich positiven Untereinheiten wurden in Koimmunpräzipitationsexperimenten auf *in vivo* Bindung mit Myc untersucht. Von allen untersuchten Flag-getaggtten Untereinheiten, die sich überexprimieren ließen, zeigte ausschließlich Med24 eine deutliche Bindung (Abb.16). In den hier gezeigten Experimenten wurde mit einem Myc-Antikörper immunpräzipitiert und Flag-Med24 im Eluat nachgewiesen. Wird umgekehrt Med24 immunpräzipitiert zeigt sich ebenfalls eine spezifische Bindung von Myc (Dorothea Maaß, persönliche Mitteilung). Der Nachweis einer Interaktion zwischen endogenem Med24 und Myc in Koimmunpräzipitationen konnte nicht erbracht werden, obwohl eine Rekrutierung des Mediatorkomplexes am Chromatin nachweisbar war (Abb.21). Das Gleiche findet man bei der Interaktion zwischen Myc und Tip60: Auch diese Interaktion ist zwar am Chromatin, nicht aber in endogenen Koimmunpräzipitationen nachweisbar (Frank et al., 2003). Möglicherweise handelt es sich bei der Interaktion zwischen Myc und diesen Kofaktoren um transiente Bindungen, die in endogenen Koimmunpräzipitationen schlecht nachweisbar sind.

Durch die Verwendung von Myc-Allelen, bei denen sukzessiv der N- bzw. der C-Terminus deletiert waren, wurde nach einer Region innerhalb des Myc-Proteins gesucht, welche für die Interaktion mit Med24 verantwortlich ist. Es zeigte sich bei allen Allelen, die ein Kernlokalisationsignal trugen, eine gleichermaßen starke Interaktion mit Med24. Hieraus kann man schließen, dass die Binderegion innerhalb des Myc-Proteins für Med24 sich über verschiedene Bereiche des Proteins verteilt.

Um die Interaktion zwischen den beiden Proteinen zu stören, könnte man in nachfolgenden Experimenten nach einer Med24-Mutante suchen, die nicht mehr an Myc bindet. Eine andere Möglichkeit wäre, einen sogenannten *loss-of-interaction*-Screen in Hefe durchzuführen, bei dem zahlreiche cDNA-Moleküle mit zufälligen Mutationen erzeugt werden und in einem Hefe-2-Hybrid (yeast-two-hybrid)-Screen auf Bindung mit Interaktionspartnern getestet werden. Dieses Verfahren wurde in unserem Labor bereits früher

erfolgreich angewandt und führte z.B. zur Identifikation einer Myc-Punktmutation (MycV394D), die ausreicht, um die Interaktion zu Miz-1 erheblich zu stören (Wu et al., 2003).

Interessant ist die Beobachtung, dass das Fehlen des NLS und die Lokalisation von Myc im Zytoplasma die Interaktion zwischen Myc und Med24 verhinderte. Obwohl die Zelllyse in dem Koimmunpräzipitationsexperiment die räumliche Trennung der beiden Proteine aufhob, blieb eine Interaktion dennoch aus. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass Myc im Kern modifiziert wird oder mit anderen Kernproteinen interagieren muss, bevor es zu einer Med24-Interaktion kommt.

5.2.3 Die Untereinheit des Mediatorkomplexes Med24

Med24 (auch Trap100, ARC/DRIP100 und CRSP100 genannt) ist ein ca. 100kDa großes Kernprotein, welches in der Maus relativ hoch in Hoden, Herz und Gehirn und eher gering in Niere, Skelettmuskulatur und Lunge exprimiert wird (Zhang und Fondell, 1999). Man findet orthologe Proteine in phylogenetisch höheren Organismen wie Drosophila, Zebrafisch und Säugern. Hefe und C.elegans tragen kein Med24-Gen. Auf Aminosäureebene zeigt der Sequenzvergleich zwischen Maus und Mensch 91% Identität und 95% Ähnlichkeit (Zhang und Fondell, 1999).

Die Struktur des Med24-Proteins zeigt Abb.26. Das Protein trägt sechs (Mensch) bzw. sieben (Maus) LxxLL-Motife (auch NR-Box genannt, L=Leuzin, x=beliebige Aminosäure), welche Interaktionsdomänen für Kernrezeptoren darstellen (Heery et al., 1997). Daneben findet man ein ATP/GTP-Bindemotif (P-Loop) und C-terminal einen Leuzin-Zipper.

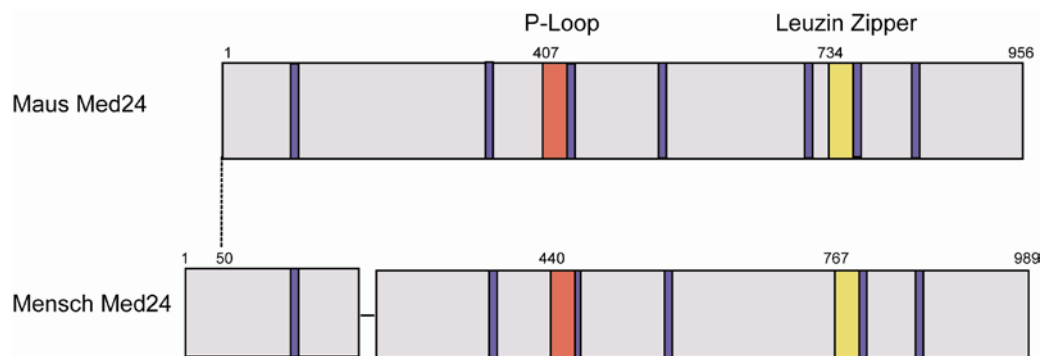


Abbildung 26: Schematische Darstellung des Med24-Proteins aus Mensch und Maus. Die Proteine enthalten 7 (Maus) bzw. 6 (Mensch) LxxLL-Boxen (blau), welche Interaktionsdomänen für Kernrezeptoren darstellen, ein ATP/GTP-Bindemotif (P-Loop, rot) sowie einen Leuzin-Zipper (gelb), der Protein-Protein-Wechselwirkungen vermittelt (nach Zhang und Fondell, 1999).

Med24 wurde zusammen mit Med1/Trap220 als Koaktivator des Thyroid-Hormons (TR)- und Vitamin D-Rezeptors (VDR) in Mauszellen beschrieben (Rachez et al., 1998; Zhang und Fondell, 1999). Die Überexpression von Med24 führte in Säugerzellen zu einer Verstärkung der Liganden-abhängigen TR- und VDR-Transkription.

Ito und Koautoren (2002) ist es gelungen, eine Med24-*knockout*-Maus zu erzeugen. Dem Mediator Komplex aus Med24^{-/-}-Zellen fehlten neben Med24 die Untereinheiten Med23 sowie Med16 und zeigt eine verringerte Bindung von Cdk8. Konsistent hierzu konnte Stevens und Koautoren (2002) bei der Charakterisierung des Med23^{-/-}-knockouts zeigen, dass Med24 und Med16 innerhalb des Mediator Komplexes fehlen. Darüber hinaus scheint der Med24-defiziente Mediator Komplex strukturell keine weiteren Defekte aufzuweisen: Der Komplex zeigt eine zum Wildtyp-Komplex vergleichbare Bindung des RNAPII-Komplexes sowie eine uneingeschränkte Bindung zahlreicher Transkriptionsfaktoren (Ito et al., 2002). Jedoch scheint die Funktion des unvollständigen Komplexes stark beeinträchtigt. Es wurde berichtet, dass die Aktivierbarkeit zahlreicher ektopischer Reporterkonstrukte von dem Vorhandensein von Med24 abhängt, was der Untereinheit (bzw. dem Subkomplex) des Mediators eine breite Rolle für transkriptionelle Aktivierung in Mauszellen zuspricht (Ito et al., 2002). Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei

der Zerstörung des Med24-Gens in Zebrafisch ein sehr spezieller Defekt innerhalb der Retina-Entwicklung (Durr et al., 2006). In Zebrafisch konnte Med24 auch als essentieller Faktor für die Entwicklung des enterischen Nervensystems (ENS) identifiziert werden (Pietsch et al., 2006). In dieser Studie wurde eine Med24-Punktmutante (Lessen, Isn) beschrieben, die einen Translationsabbruch in Aminoäure 63 und den Funktionsverlust des Proteins zur Folge hat. Es zeigte sich hierbei eine signifikante Reduktion der Proliferation der ENS-Vorläuferzellen in einem späten Stadium.

5.2.4 In transienten Transkriptionsassays übt Med24 keinen deutlichen Effekt auf die Myc-vermittelte Transaktivierung aus

Abb.20 zeigt, dass sich die Transaktivierung des Reporters durch Myc nicht wesentlich durch Med24 beeinflussen ließ. Bei höherer Konzentration von Med24 zeigte sich eine geringfügige Hemmung der Myc-vermittelten Transaktivierung. Konsistent hierzu konnte in Med24-knockdown-Zellen gegenüber der Kontrollzellen ein geringfügiger Anstieg in der Transaktivierung beobachtet werden (Dorothea Maaß, persönliche Mitteilung). In beiden Fällen sind die beobachteten Effekte jedoch sehr gering. Da die DNA in den transienten Assays zudem als ektopisches Plasmid vorliegt und nicht im Chromatin verpackt ist, kann die biologische Relevanz der Beobachtungen schwer beurteilt werden.

5.2.5 Die Reduktion von Med24 bedingt die Deregulation zahlreicher Myc-Zielgene

HeLa-Zellen, in denen durch shRNA-vermittelten knockdown die Expression von Med24 stark reduziert war (Abb.23) zeigten in der cDNA-Microarray-Analyse eine überproportional hohe Anzahl von Myc-Zielgenen dereguliert (Abb.24, Tabelle 3). Der größte Teil der deregulierten Myc-Zielgene zeigte in den knockdown-Zellen gegenüber der Scramble-Kontrolle ein herabgesetztes Expressionsniveau, was Med24 eine Rolle in ihrer Aktivierung zuspricht.

Eine kürzlich durchgeführte Microarray-Analyse mit murinen NIH3T3/Myc-ER-Zellen zeigte, dass nach knockdown von Med24 nahezu keines der Myc-

aktivierten Zielgene mehr durch Myc regulierbar waren (Till Kortüm, persönliche Mitteilung). Außerdem zeigte sich bei einer Vielzahl von Genen eine Erhöhung der Basalaktivität in den shMed24-Zellen gegenüber der Scramble-Kontrolle, ein Hinweis darauf, dass die Gegenwart von Med24 in dem Komplex wichtig für eine negative Regulation dieser Gene ist.

Die Depletion der Untereinheit Cdk8 in diesen Zellen hatte einen sehr ähnlichen Effekt: Die Basalaktivität zahlreicher Myc-Zielgene war in den shCdk8-Zellen gegenüber der Scramble-Kontrolle stark erhöht, und Myc-ER war nach OHT-Aktivierung kaum noch in der Lage, diese Gene weiter zu transaktivieren. Hierbei ist noch unklar, ob die erhöhte Basalaktivität die Myc-Transaktivierung überdeckt oder ob die Myc-Transaktivierung tatsächlich von Cdk8 abhängt. Denkbar wäre ein Mechanismus, bei dem Myc über die Bindung von Med24 die fakultative Untereinheit Cdk8 aus dem Mediator Komplex verdrängt und somit die Derepression des Gens induziert. Das ChIP-Experiment in P493-6-Zellen (Abb.22) zeigte keine Myc-abhängigen Veränderungen einer Cdk8-Bindung an dem Myc-reprimierten Zielgen *c/EBP α* . Es wäre interessant, die Myc-Abhängigkeit einer Cdk8-Bindung an einem der Cdk8-abhängigen, Myc-aktivierten Zielgene aus dem oben beschriebenen murinen Myc-ER-Zellen zu untersuchen. Dem Mediator Komplex aus embryonalen Fibroblasten von Med24-knockout-Mäusen fehlen die Untereinheiten Med16 und Med23 und es wurde eine Verringerung der Cdk8-Bindung nachgewiesen (Ito et al., 2002). Somit könnte eine reduzierte Affinität von Cdk8 zu dem Komplex auch die Ursache für die beobachteten Effekte in den Med24-depletierten Zellen sein. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass nach Depletion von Med24 in HeLa-Zellen eine Derepression der Basalaktivität von Myc-Zielgenen nicht auftrat (Abb. 24). Möglicherweise ist aufgrund von strukturellen Unterschieden zwischen dem murinen und humanen Mediator Komplex die Affinität des fakultativen Cdk8-Moduls in humanen Zellen weniger abhängig von Med24 als in murinen Zellen.

6 Zusammenfassung

Das Proto-Onkogen c-MYC spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung zahlreicher humaner Tumoren. Um zu verstehen, wie Myc in der Tumorigenese wirkt, sind Kenntnisse über Interaktionspartner und Wirkmechanismen von Myc sehr wichtig. Myc ist ein evolutionär konservierter Transkriptionsfaktor, der Gene aktivieren oder reprimieren kann, wobei diesen Funktionen verschiedene und zum Teil wenig verstandene Mechanismen zugrunde liegen.

In der vorliegenden Arbeit wurden transkriptionelle Regulationsmechanismen von Myc sowie biochemische Interaktionen mit Kofaktoren an den genomischen Myc-Bindestellen eines aktivierten (Nukleolin) und eines reprimierten Zielgens (*c/EBP α*) untersucht. Es wurde gezeigt, dass MB2-abhängige Kofaktoren nicht diffentiell zu beiden Zielgenen rekrutiert werden. Myc-induzierte Histon-Acetylierung sowie Serin5-Phosphorylierung des RNAPII-Komplexes wurde ebenfalls an beiden Zielgenen nachgewiesen. Der Kofaktor p300 sowie der Mediatorkomplex werden hingegen selektiv nur zu dem Myc-aktivierten Zielgen rekrutiert. Durch *in vitro*- und *in vivo*-Interaktionsstudien wurde Med24 als Myc-interagierende Untereinheit des Mediatorkomplexes identifiziert und durch RNA-Interferenz-basierte Gendepletion von Med24 in HeLa-Zellen konnte die Bedeutung von Med24 für die Transaktivierung von Myc nachgewiesen werden.

6.1 Abstract

The c-myc proto-oncogene plays a crucial role in the development of numerous human tumors. To understand how Myc is acting in tumorigenesis, knowledge of interacting proteins and mechanisms is very important. c-myc encodes an evolutionary conserved transcription factor (Myc) that can both activate and repress transcription. There are different and in part poorly understood mechanisms underlying these functions.

In the present work, transcriptional mechanisms of Myc and cofactor interactions were investigated at genomic Myc-binding sites of an activated gene (nucleolin) and a repressed gene (c/EBP α). It was shown that MB2-dependent cofactors are recruited to both target genes. In addition Myc-induced histone H4-acetylation as well as serine 5 phosphorylation of the RNAPII complex could be detected on both target genes. The cofactor p300 and the mediator complex instead were recruited only to the Myc-activated gene. Using *in vitro*- and *in vivo*-interaction assays, Med24 was identified as a Myc-interacting subunit of the mediator complex. siRNA-based depletion of Med24 in HeLa cells could demonstrate the importance of Med24 for the transactivation function of Myc.

7 Literaturverzeichnis

- Adhikary, S., and Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 635-645.
- Adhikary, S., Marinoni, F., Hock, A., Hulleman, E., Popov, N., Beier, R., Bernard, S., Quarto, M., Capra, M., Goettig, S., *et al.* (2005). The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. *Cell* 123, 409-421.
- Adhikary, S., Peukert, K., Karsunky, H., Beuger, V., Lutz, W., Elsasser, H. P., Moroy, T., and Eilers, M. (2003). Miz1 is required for early embryonic development during gastrulation. *Mol Cell Biol* 23, 7648-7657.
- Agalioti, T., Chen, G., and Thanos, D. (2002). Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* 111, 381-392.
- Akoulitchev, S., Chuikov, S., and Reinberg, D. (2000). TFIID is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* 407, 102-106.
- Almendral, J. M., Sommer, D., Macdonald-Bravo, H., Burckhardt, J., Perera, J., and Bravo, R. (1988). Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol* 8, 2140-2148.
- Amati, B. (2004). Myc degradation: dancing with ubiquitin ligases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8843-8844.
- Amati, B., Brooks, M. W., Levy, N., Littlewood, T. D., Evan, G. I., and Land, H. (1993a). Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell* 72, 233-245.
- Amati, B., Frank, S. R., Donjerkovic, D., and Taubert, S. (2001). Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription. *Biochim Biophys Acta* 1471, M135-145.
- Amati, B., Littlewood, T. D., Evan, G. I., and Land, H. (1993b). The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *Embo J* 12, 5083-5087.
- Amin, C., Wagner, A. J., and Hay, N. (1993). Sequence-specific transcriptional activation by Myc and repression by Max. *Mol Cell Biol* 13, 383-390.
- Amundson, S. A., Zhan, Q., Penn, L. Z., and Fornace, A. J., Jr. (1998). Myc suppresses induction of the growth arrest genes gadd34, gadd45, and gadd153 by DNA-damaging agents. *Oncogene* 17, 2149-2154.
- Andrau, J. C., van de Pasch, L., Lijnzaad, P., Bijma, T., Koerkamp, M. G., van de Peppel, J., Werner, M., and Holstege, F. C. (2006). Genome-wide location of the coactivator mediator: Binding without activation and transient Cdk8 interaction on DNA. *Mol Cell* 22, 179-192.

- Antonson, P., Pray, M. G., Jacobsson, A., and Xanthopoulos, K. G. (1995). Myc inhibits CCAAT/enhancer-binding protein alpha-gene expression in HIB-1B hibernoma cells through interactions with the core promoter region. *Eur J Biochem* 232, 397-403.
- Arabi, A., Wu, S., Ridderstrale, K., Bierhoff, H., Shiue, C., Fatyol, K., Fahlen, S., Hydbring, P., Soderberg, O., Grummt, I., *et al.* (2005). c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* 7, 303-310.
- Asturias, F. J., Jiang, Y. W., Myers, L. C., Gustafsson, C. M., and Kornberg, R. D. (1999). Conserved structures of mediator and RNA polymerase II holoenzyme. *Science* 283, 985-987.
- Balciunas, D., Galman, C., Ronne, H., and Bjorklund, S. (1999). The Med1 subunit of the yeast mediator complex is involved in both transcriptional activation and repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 376-381.
- Bar-Ner, M., Messing, L. T., Cultraro, C. M., Birrer, M. J., and Segal, S. (1992). Regions within the c-Myc protein that are necessary for transformation are also required for inhibition of differentiation of murine erythroleukemia cells. *Cell Growth Differ* 3, 183-190.
- Barrett, J., Birrer, M. J., Kato, G. J., Dosaka-Akita, H., and Dang, C. V. (1992). Activation domains of L-Myc and c-Myc determine their transforming potencies in rat embryo cells. *Mol Cell Biol* 12, 3130-3137.
- Barsyte-Lovejoy, D., Mao, D. Y., and Penn, L. Z. (2004). c-Myc represses the proximal promoters of GADD45a and GADD153 by a post-RNA polymerase II recruitment mechanism. *Oncogene* 23, 3481-3486.
- Belakavadi, M., and Fondell, J. D. (2006). Role of the mediator complex in nuclear hormone receptor signaling. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 156, 23-43.
- Bello-Fernandez, C., Packham, G., and Cleveland, J. L. (1993). The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7804-7808.
- Bellosta, P., Hulf, T., Balla Diop, S., Usseglio, F., Pradel, J., Aragnol, D., and Gallant, P. (2005). Myc interacts genetically with Tip48/Reptin and Tip49/Pontin to control growth and proliferation during *Drosophila* development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11799-11804.
- Bernard, S., and Eilers, M. (2006). Control of cell proliferation and growth by Myc proteins. *Results Probl Cell Differ* 42, 329-342.
- Berwanger, B., Hartmann, O., Bergmann, E., Bernard, S., Nielsen, D., Krause, M., Kartal, A., Flynn, D., Wiedemeyer, R., Schwab, M., *et al.* (2002). Loss of a FYN-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma. *Cancer Cell* 2, 377-386.

- Bhatia, K., Huppi, K., Spangler, G., Siwarski, D., Iyer, R., and Magrath, I. (1993). Point mutations in the c-Myc transactivation domain are common in Burkitt's lymphoma and mouse plasmacytomas. *Nat Genet* 5, 56-61.
- Blackwood, E. M., and Eisenman, R. N. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251, 1211-1217.
- Blazek, E., Mittler, G., and Meisterernst, M. (2005). The mediator of RNA polymerase II. *Chromosoma* 113, 399-408.
- Bouchard, C., Dittrich, O., Kiermaier, A., Dohmann, K., Menkel, A., Eilers, M., and Luscher, B. (2001). Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes Dev* 15, 2042-2047.
- Bouchard, C., Marquardt, J., Bras, A., Medema, R. H., and Eilers, M. (2004). Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *Embo J* 23, 2830-2840.
- Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J., and Eilers, M. (1999). Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J* 18, 5321-5333.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Lorient, A., Vire, E., De Smet, C., Gutierrez, A., Danovi, D., Bernard, D., Boon, T., *et al.* (2005). Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *Embo J* 24, 336-346.
- Brown, C. E., Lechner, T., Howe, L., and Workman, J. L. (2000). The many HATs of transcription coactivators. *Trends Biochem Sci* 25, 15-19.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2, 243-247.
- Bryant, G. O., and Ptashne, M. (2003). Independent recruitment in vivo by Gal4 of two complexes required for transcription. *Mol Cell* 11, 1301-1309.
- Bull, J. J., Muller-Rover, S., Patel, S. V., Chronnell, C. M., McKay, I. A., and Philpott, M. P. (2001). Contrasting localization of c-Myc with other Myc superfamily transcription factors in the human hair follicle and during the hair growth cycle. *J Invest Dermatol* 116, 617-622.
- Cai, Y., Jin, J., Florens, L., Swanson, S. K., Kusch, T., Li, B., Workman, J. L., Washburn, M. P., Conaway, R. C., and Conaway, J. W. (2005). The mammalian YL1 protein is a shared subunit of the TRRAP/TIP60 histone acetyltransferase and SRCAP complexes. *J Biol Chem* 280, 13665-13670.

Chi, Y., Huddleston, M. J., Zhang, X., Young, R. A., Annan, R. S., Carr, S. A., and Deshaies, R. J. (2001). Negative regulation of Gcn4 and Msn2 transcription factors by Srb10 cyclin-dependent kinase. *Genes Dev* 15, 1078-1092.

Claassen, G. F., and Hann, S. R. (1999). Myc-mediated transformation: the repression connection. *Oncogene* 18, 2925-2933.

Coller, H. A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E. S., Eisenman, R. N., and Golub, T. R. (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3260-3265.

Conaway, J. W., Florens, L., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Parmely, T. J., Yao, T., Swanson, S. K., Banks, C. A., Washburn, M. P., and Conaway, R. C. (2005). The mammalian Mediator complex. *FEBS Lett* 579, 904-908.

Conzen, S. D., Gottlob, K., Kandel, E. S., Khanduri, P., Wagner, A. J., O'Leary, M., and Hay, N. (2000). Induction of cell cycle progression and acceleration of apoptosis are two separable functions of c-Myc: transrepression correlates with acceleration of apoptosis. *Mol Cell Biol* 20, 6008-6018.

Covitz, P. A., Song, W., and Mitchell, A. P. (1994). Requirement for RGR1 and SIN4 in RME1-dependent repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 138, 577-586.

Dahmus, M. E. (1995). Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Biochim Biophys Acta* 1261, 171-182.

Dang, C. V., and Lee, W. M. (1988). Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal. *Mol Cell Biol* 8, 4048-4054.

Dauphinot, L., De Oliveira, C., Melot, T., Sevenet, N., Thomas, V., Weissman, B. E., and Delattre, O. (2001). Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. *Oncogene* 20, 3258-3265.

Davis, J. A., Takagi, Y., Kornberg, R. D., and Asturias, F. A. (2002). Structure of the yeast RNA polymerase II holoenzyme: Mediator conformation and polymerase interaction. *Mol Cell* 10, 409-415.

DePinho, R. A., Schreiber-Agus, N., and Alt, F. W. (1991). myc family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res* 57, 1-46.

Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., and Zhou, M. M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399, 491-496.

Dotson, M. R., Yuan, C. X., Roeder, R. G., Myers, L. C., Gustafsson, C. M., Jiang, Y. W., Li, Y., Kornberg, R. D., and Asturias, F. J. (2000). Structural organization of yeast and mammalian mediator complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14307-14310.

- Dugan, K. A., Wood, M. A., and Cole, M. D. (2002). TIP49, but not TRRAP, modulates c-Myc and E2F1 dependent apoptosis. *Oncogene* 21, 5835-5843.
- Durr, K., Holzschuh, J., Filippi, A., Ettl, A. K., Ryu, S., Shepherd, I. T., and Driever, W. (2006). Differential roles of transcriptional mediator complex subunits Crsp34/Med27, Crsp150/Med14 and Trap100/Med24 during zebrafish retinal development. *Genetics* 174, 693-705.
- Eberhardy, S. R., and Farnham, P. J. (2001). c-Myc mediates activation of the cad promoter via a post-RNA polymerase II recruitment mechanism. *J Biol Chem* 276, 48562-48571.
- Eberhardy, S. R., and Farnham, P. J. (2002). Myc recruits P-TEFb to mediate the final step in the transcriptional activation of the cad promoter. *J Biol Chem* 277, 40156-40162.
- Elmlund, H., Baraznenok, V., Lindahl, M., Samuelsen, C. O., Koeck, P. J., Holmberg, S., Hebert, H., and Gustafsson, C. M. (2006). The cyclin-dependent kinase 8 module sterically blocks Mediator interactions with RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15788-15793.
- Etard, C., Gradl, D., Kunz, M., Eilers, M., and Wedlich, D. (2005). Pontin and Reptin regulate cell proliferation in early *Xenopus* embryos in collaboration with c-Myc and Miz-1. *Mech Dev* 122, 545-556.
- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G., and Bishop, J. M. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 5, 3610-3616.
- Facchini, L. M., and Penn, L. Z. (1998). The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *Faseb J* 12, 633-651.
- Fan, X., Chou, D. M., and Struhl, K. (2006). Activator-specific recruitment of Mediator in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 13, 117-120.
- Fernandez, P. C., Frank, S. R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A., and Amati, B. (2003). Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev* 17, 1115-1129.
- Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C. D. (2003). Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* 425, 475-479.
- Flanagan, P. M., Kelleher, R. J., 3rd, Sayre, M. H., Tschochner, H., and Kornberg, R. D. (1991). A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription in vitro. In *Nature*, pp. 436-438.
- Fondell, J. D., Ge, H., and Roeder, R. G. (1996). Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8329-8333.
- Fondell, J. D., Guermah, M., Malik, S., and Roeder, R. G. (1999). Thyroid hormone receptor-associated proteins and general positive cofactors mediate

- thyroid hormone receptor function in the absence of the TATA box-binding protein-associated factors of TFIID. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1959-1964.
- Frank, S. R., Parisi, T., Taubert, S., Fernandez, P., Fuchs, M., Chan, H. M., Livingston, D. M., and Amati, B. (2003). MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO Rep* 4, 575-580.
- Frank, S. R., Schroeder, M., Fernandez, P., Taubert, S., and Amati, B. (2001). Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation. *Genes Dev* 15, 2069-2082.
- Freytag, S. O., and Geddes, T. J. (1992). Reciprocal regulation of adipogenesis by Myc and C/EBP alpha. *Science* 256, 379-382.
- Furumoto, T., Tanaka, A., Ito, M., Malik, S., Hirose, Y., Hanaoka, F., and Ohkuma, Y. (2007). A kinase subunit of the human mediator complex, CDK8, positively regulates transcriptional activation. *Genes Cells* 12, 119-132.
- Gandarillas, A., and Watt, F. M. (1997). c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. *Genes Dev* 11, 2869-2882.
- Gartel, A. L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F., and Tyner, A. L. (2001). Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4510-4515.
- Gaubatz, S., Imhof, A., Dosch, R., Werner, O., Mitchell, P., Buettner, R., and Eilers, M. (1995). Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2. *Embo J* 14, 1508-1519.
- Ge, K., Guermah, M., Yuan, C. X., Ito, M., Wallberg, A. E., Spiegelman, B. M., and Roeder, R. G. (2002). Transcription coactivator TRAP220 is required for PPAR gamma 2-stimulated adipogenesis. *Nature* 417, 563-567.
- Gebhardt, A., Frye, M., Herold, S., Benitah, S. A., Braun, K., Samans, B., Watt, F. M., Elsasser, H. P., and Eilers, M. (2006). Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1. *J Cell Biol* 172, 139-149.
- Gerbitz, A., Mautner, J., Geltinger, C., Hortnagel, K., Christoph, B., Asenbauer, H., Klobeck, G., Polack, A., and Bornkamm, G. W. (1999). Deregulation of the proto-oncogene c-myc through t(8;22) translocation in Burkitt's lymphoma. *Oncogene* 18, 1745-1753.
- Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R. N., and White, R. J. (2003). Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* 421, 290-294.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5547-5551.

Grandori, C., Gomez-Roman, N., Felton-Edkins, Z. A., Ngouenet, C., Galloway, D. A., Eisenman, R. N., and White, R. J. (2005). c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat Cell Biol* 7, 311-318.

Gray, S. G., and Ekstrom, T. J. (2001). The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res* 262, 75-83.

Grignani, F., Kinsella, T., Mencarelli, A., Valtieri, M., Riganelli, D., Lanfrancone, L., Peschle, C., Nolan, G. P., and Pelicci, P. G. (1998). High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res* 58, 14-19.

Gu, W., Malik, S., Ito, M., Yuan, C. X., Fondell, J. D., Zhang, X., Martinez, E., Qin, J., and Roeder, R. G. (1999). A novel human SRB/MED-containing cofactor complex, SMCC, involved in transcription regulation. *Mol Cell* 3, 97-108.

Guccione, E., Martinato, F., Finocchiaro, G., Luzi, L., Tizzoni, L., Dall' Olio, V., Zardo, G., Nervi, C., Bernard, L., and Amati, B. (2006). Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nat Cell Biol* 8, 764-770.

Guglielmi, B., van Berkum, N. L., Klapholz, B., Bijma, T., Boube, M., Boschiero, C., Bourbon, H. M., Holstege, F. C., and Werner, M. (2004). A high resolution protein interaction map of the yeast Mediator complex. *Nucleic Acids Res* 32, 5379-5391.

Gwack, Y., Baek, H. J., Nakamura, H., Lee, S. H., Meisterernst, M., Roeder, R. G., and Jung, J. U. (2003). Principal role of TRAP/mediator and SWI/SNF complexes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus RTA-mediated lytic reactivation. *Mol Cell Biol* 23, 2055-2067.

Haggerty, T. J., Zeller, K. I., Osthus, R. C., Wonsey, D. R., and Dang, C. V. (2003). A strategy for identifying transcription factor binding sites reveals two classes of genomic c-Myc target sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5313-5318.

Hallberg, M., Polozkov, G. V., Hu, G. Z., Beve, J., Gustafsson, C. M., Ronne, H., and Bjorklund, S. (2004). Site-specific Srb10-dependent phosphorylation of the yeast Mediator subunit Med2 regulates gene expression from the 2-microm plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3370-3375.

Hann, S. R., Thompson, C. B., and Eisenman, R. N. (1985). c-myc oncogene protein synthesis is independent of the cell cycle in human and avian cells. *Nature* 314, 366-369.

Hateboer, G., Timmers, H. T., Rustgi, A. K., Billaud, M., van 't Veer, L. J., and Bernards, R. (1993). TATA-binding protein and the retinoblastoma gene product

bind to overlapping epitopes on c-Myc and adenovirus E1A protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8489-8493.

He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509-1512.

Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M. G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733-736.

Hengartner, C. J., Myer, V. E., Liao, S. M., Wilson, C. J., Koh, S. S., and Young, R. A. (1998). Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol Cell* 2, 43-53.

Hengartner, C. J., Thompson, C. M., Zhang, J., Chao, D. M., Liao, S. M., Koleske, A. J., Okamura, S., and Young, R. A. (1995). Association of an activator with an RNA polymerase II holoenzyme. *Genes Dev* 9, 897-910.

Henriksson, M., and Luscher, B. (1996). Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res* 68, 109-182.

Herbst, A., Hemann, M. T., Tworkowski, K. A., Salghetti, S. E., Lowe, S. W., and Tansey, W. P. (2005). A conserved element in Myc that negatively regulates its proapoptotic activity. *EMBO Rep* 6, 177-183.

Herceg, Z., Li, H., Cuenin, C., Shukla, V., Radolf, M., Steinlein, P., and Wang, Z. Q. (2003). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the HAT cofactor Trrap in conditional knockout cells. *Nucleic Acids Res* 31, 7011-7023.

Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V., Frohme, C., Beul, D., Hillukkala, T., Syvaioja, J., Saluz, H. P., Haenel, F., and Eilers, M. (2002). Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol Cell* 10, 509-521.

Hirst, M., Kobor, M. S., Kuriakose, N., Greenblatt, J., and Sadowski, I. (1999). GAL4 is regulated by the RNA polymerase II holoenzyme-associated cyclin-dependent protein kinase SRB10/CDK8. *Mol Cell* 3, 673-678.

Holstege, F. C., Jennings, E. G., Wyrick, J. J., Lee, T. I., Hengartner, C. J., Green, M. R., Golub, T. R., Lander, E. S., and Young, R. A. (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* 95, 717-728.

Ikura, T., Ogryzko, V. V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully, R., Qin, J., and Nakatani, Y. (2000). Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* 102, 463-473.

Ito, M., Okano, H. J., Darnell, R. B., and Roeder, R. G. (2002). The TRAP100 component of the TRAP/Mediator complex is essential in broad transcriptional events and development. *Embo J* 21, 3464-3475.

- Ito, M., Yuan, C. X., Malik, S., Gu, W., Fondell, J. D., Yamamura, S., Fu, Z. Y., Zhang, X., Qin, J., and Roeder, R. G. (1999). Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. *Mol Cell* 3, 361-370.
- Izumi, H., Molander, C., Penn, L. Z., Ishisaki, A., Kohno, K., and Funa, K. (2001). Mechanism for the transcriptional repression by c-Myc on PDGF beta-receptor. *J Cell Sci* 114, 1533-1544.
- Jiang, Y. W., and Stillman, D. J. (1992). Involvement of the SIN4 global transcriptional regulator in the chromatin structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 12, 4503-4514.
- Johnson, B. E., Brennan, J. F., Ihde, D. C., and Gazdar, A. F. (1992). myc family DNA amplification in tumors and tumor cell lines from patients with small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 39-43.
- Judware, R., and Culp, L. A. (1995). Over-expression of transfected N-myc oncogene in human SKNSH neuroblastoma cells down-regulates expression of beta 1 integrin subunit. *Oncogene* 11, 2599-2607.
- Kadosh, D., and Struhl, K. (1998). Histone deacetylase activity of Rpd3 is important for transcriptional repression in vivo. *Genes Dev* 12, 797-805.
- Kamakaka, R. T., and Biggins, S. (2005). Histone variants: deviants? *Genes Dev* 19, 295-310.
- Kang, J. S., Kim, S. H., Hwang, M. S., Han, S. J., Lee, Y. C., and Kim, Y. J. (2001). The structural and functional organization of the yeast mediator complex. *J Biol Chem* 276, 42003-42010.
- Kato, G. J., Barrett, J., Villa-Garcia, M., and Dang, C. V. (1990). An amino-terminal c-myc domain required for neoplastic transformation activates transcription. *Mol Cell Biol* 10, 5914-5920.
- Kato, Y., Habas, R., Katsuyama, Y., Naar, A. M., and He, X. (2002). A component of the ARC/Mediator complex required for TGF beta/Nodal signalling. *Nature* 418, 641-646.
- Kelleher, R. J., 3rd, Flanagan, P. M., and Kornberg, R. D. (1990). A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell* 61, 1209-1215.
- Kelly, K., Cochran, B. H., Stiles, C. D., and Leder, P. (1983). Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* 35, 603-610.
- Kim, Y. J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayre, M. H., and Kornberg, R. D. (1994). A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 77, 599-608.

Knoepfler, P. S., Zhang, X. Y., Cheng, P. F., Gafken, P. R., McMahon, S. B., and Eisenman, R. N. (2006). Myc influences global chromatin structure. *Embo J* 25, 2723-2734.

Koleske, A. J., Buratowski, S., Nonet, M., and Young, R. A. (1992). A novel transcription factor reveals a functional link between the RNA polymerase II CTD and TFIID. *Cell* 69, 883-894.

Koleske, A. J., and Young, R. A. (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* 368, 466-469.

Kornberg, R. D. (2005). Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem Sci* 30, 235-239.

Krishnamurthy, S., He, X., Reyes-Reyes, M., Moore, C., and Hampsey, M. (2004). Ssu72 is an RNA polymerase II CTD phosphatase. *Mol Cell* 14, 387-394.

Kuras, L., Borggreffe, T., and Kornberg, R. D. (2003). Association of the Mediator complex with enhancers of active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13887-13891.

Kurdistani, S. K., and Grunstein, M. (2003). In vivo protein-protein and protein-DNA crosslinking for genomewide binding microarray. *Methods* 31, 90-95.

Kusch, T., Florens, L., Macdonald, W. H., Swanson, S. K., Glaser, R. L., Yates, J. R., 3rd, Abmayr, S. M., Washburn, M. P., and Workman, J. L. (2004). Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science* 306, 2084-2087.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lee, L. A., Dolde, C., Barrett, J., Wu, C. S., and Dang, C. V. (1996). A link between c-Myc-mediated transcriptional repression and neoplastic transformation. *J Clin Invest* 97, 1687-1695.

Lee, Y. C., Min, S., Gim, B. S., and Kim, Y. J. (1997). A transcriptional mediator protein that is required for activation of many RNA polymerase II promoters and is conserved from yeast to humans. *Mol Cell Biol* 17, 4622-4632.

Levine, M., and Tjian, R. (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424, 147-151.

Lewis, B. A., and Reinberg, D. (2003). The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation. *J Cell Sci* 116, 3667-3675.

Li, L. H., Nerlov, C., Prendergast, G., MacGregor, D., and Ziff, E. B. (1994). c-Myc represses transcription in vivo by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II. *Embo J* 13, 4070-4079.

- Li, Q., Imhof, A., Collingwood, T. N., Urnov, F. D., and Wolffe, A. P. (1999). p300 stimulates transcription instigated by ligand-bound thyroid hormone receptor at a step subsequent to chromatin disruption. *Embo J* 18, 5634-5652.
- Li, Z., Van Calcar, S., Qu, C., Cavenee, W. K., Zhang, M. Q., and Ren, B. (2003). A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8164-8169.
- Linder, T., Zhu, X., Baraznenok, V., and Gustafsson, C. M. (2006). The classical *trb4-138* mutant allele causes dissociation of yeast Mediator. *Biochem Biophys Res Commun* 349, 948-953.
- Littlewood, T. D., Amati, B., Land, H., and Evan, G. I. (1992). Max and c-Myc/Max DNA-binding activities in cell extracts. *Oncogene* 7, 1783-1792.
- Maheswaran, S., Lee, H., and Sonenshein, G. E. (1994). Intracellular association of the protein product of the c-myc oncogene with the TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* 14, 1147-1152.
- Mai, S., and Martensson, I. L. (1995). The c-myc protein represses the lambda 5 and TdT initiators. *Nucleic Acids Res* 23, 1-9.
- Malik, S., Baek, H. J., Wu, W., and Roeder, R. G. (2005). Structural and functional characterization of PC2 and RNA polymerase II-associated subpopulations of metazoan Mediator. *Mol Cell Biol* 25, 2117-2129.
- Malik, S., Guermah, M., and Roeder, R. G. (1998). A dynamic model for PC4 coactivator function in RNA polymerase II transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2192-2197.
- Malik, S., Wallberg, A. E., Kang, Y. K., and Roeder, R. G. (2002). TRAP/SMCC/mediator-dependent transcriptional activation from DNA and chromatin templates by orphan nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *Mol Cell Biol* 22, 5626-5637.
- Mao, D. Y., Watson, J. D., Yan, P. S., Barsyte-Lovejoy, D., Khosravi, F., Wong, W. W., Farnham, P. J., Huang, T. H., and Penn, L. Z. (2003). Analysis of Myc bound loci identified by CpG island arrays shows that Max is essential for Myc-dependent repression. *Curr Biol* 13, 882-886.
- Marhin, W. W., Chen, S., Facchini, L. M., Fornace, A. J., Jr., and Penn, L. Z. (1997). Myc represses the growth arrest gene *gadd45*. *Oncogene* 14, 2825-2834.
- Marhin, W. W., Hei, Y. J., Chen, S., Jiang, Z., Gallie, B. L., Phillips, R. A., and Penn, L. Z. (1996). Loss of Rb and Myc activation co-operate to suppress cyclin D1 and contribute to transformation. *Oncogene* 12, 43-52.
- Marr, M. T., 2nd, Isogai, Y., Wright, K. J., and Tjian, R. (2006). Coactivator cross-talk specifies transcriptional output. *Genes Dev* 20, 1458-1469.

McMahon, S. B., Van Buskirk, H. A., Dugan, K. A., Copeland, T. D., and Cole, M. D. (1998). The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell* 94, 363-374.

McMahon, S. B., Wood, M. A., and Cole, M. D. (2000). The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol Cell Biol* 20, 556-562.

Meisterernst, M., Roy, A. L., Lieu, H. M., and Roeder, R. G. (1991). Activation of class II gene transcription by regulatory factors is potentiated by a novel activity. *Cell* 66, 981-993.

Meneghini, M. D., Wu, M., and Madhani, H. D. (2003). Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* 112, 725-736.

Menssen, A., and Hermeking, H. (2002). Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6274-6279.

Misteli, T. (2001). Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science* 291, 843-847.

Mittler, G., Stuhler, T., Santolin, L., Uhlmann, T., Kremmer, E., Lottspeich, F., Berti, L., and Meisterernst, M. (2003). A novel docking site on Mediator is critical for activation by VP16 in mammalian cells. *Embo J* 22, 6494-6504.

Mo, X., Kowenz-Leutz, E., Xu, H., and Leutz, A. (2004). Ras induces mediator complex exchange on C/EBP beta. *Mol Cell* 13, 241-250.

Morgenbesser, S. D., and DePinho, R. A. (1994). Use of transgenic mice to study myc family gene function in normal mammalian development and in cancer. *Semin Cancer Biol* 5, 21-36.

Muchardt, C., and Yaniv, M. (1999). ATP-dependent chromatin remodelling: SWI/SNF and Co. are on the job. *J Mol Biol* 293, 187-198.

Myers, L. C., Gustafsson, C. M., Bushnell, D. A., Lui, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Kornberg, R. D. (1998). The Med proteins of yeast and their function through the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 12, 45-54.

Myers, L. C., Gustafsson, C. M., Hayashibara, K. C., Brown, P. O., and Kornberg, R. D. (1999). Mediator protein mutations that selectively abolish activated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 67-72.

Naar, A. M., Beaurang, P. A., Robinson, K. M., Oliner, J. D., Avizonis, D., Scheek, S., Zwicker, J., Kadonaga, J. T., and Tjian, R. (1998). Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a in vitro. *Genes Dev* 12, 3020-3031.

Nair, D., Kim, Y., and Myers, L. C. (2005). Mediator and TFIID govern carboxyl-terminal domain-dependent transcription in yeast extracts. *J Biol Chem* 280, 33739-33748.

Nair, S. K., and Burley, S. K. (2003). X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA. Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors. *Cell* 112, 193-205.

Narlikar, G. J., Fan, H. Y., and Kingston, R. E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108, 475-487.

Nau, M. M., Brooks, B. J., Battey, J., Sausville, E., Gazdar, A. F., Kirsch, I. R., McBride, O. W., Bertness, V., Hollis, G. F., and Minna, J. D. (1985). L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature* 318, 69-73.

Nelson, C., Goto, S., Lund, K., Hung, W., and Sadowski, I. (2003). Srb10/Cdk8 regulates yeast filamentous growth by phosphorylating the transcription factor Ste12. *Nature* 421, 187-190.

Nikiforov, M. A., Chandriani, S., Park, J., Kotenko, I., Matheos, D., Johnsson, A., McMahon, S. B., and Cole, M. D. (2002). TRRAP-dependent and TRRAP-independent transcriptional activation by Myc family oncoproteins. *Mol Cell Biol* 22, 5054-5063.

Nilsson, J. A., and Cleveland, J. L. (2003). Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene* 22, 9007-9021.

Nilsson, J. A., Maclean, K. H., Keller, U. B., Pendeville, H., Baudino, T. A., and Cleveland, J. L. (2004). Mnt loss triggers Myc transcription targets, proliferation, apoptosis, and transformation. *Mol Cell Biol* 24, 1560-1569.

Noguchi, M., Hirohashi, S., Hara, F., Kojima, A., Shimosato, Y., Shinkai, T., and Tsuchiya, R. (1990). Heterogenous amplification of myc family oncogenes in small cell lung carcinoma. *Cancer* 66, 2053-2058.

O'Connell, B. C., Cheung, A. F., Simkevich, C. P., Tam, W., Ren, X., Mateyak, M. K., and Sedivy, J. M. (2003). A large scale genetic analysis of c-Myc-regulated gene expression patterns. *J Biol Chem* 278, 12563-12573.

O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V., and Mendell, J. T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435, 839-843.

Orian, A., van Steensel, B., Delrow, J., Bussemaker, H. J., Li, L., Sawado, T., Williams, E., Loo, L. W., Cowley, S. M., Yost, C., *et al.* (2003). Genomic binding by the Drosophila Myc, Max, Mad/Mnt transcription factor network. *Genes Dev* 17, 1101-1114.

- Oster, S. K., Mao, D. Y., Kennedy, J., and Penn, L. Z. (2003). Functional analysis of the N-terminal domain of the Myc oncoprotein. *Oncogene* 22, 1998-2010.
- Oster, S. K., Marhin, W. W., Asker, C., Facchini, L. M., Dion, P. A., Funa, K., Post, M., Sedivy, J. M., and Penn, L. Z. (2000). Myc is an essential negative regulator of platelet-derived growth factor beta receptor expression. *Mol Cell Biol* 20, 6768-6778.
- Owen, D. J., Ornaghi, P., Yang, J. C., Lowe, N., Evans, P. R., Ballario, P., Neuhaus, D., Filetici, P., and Travers, A. A. (2000). The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *Embo J* 19, 6141-6149.
- Pajic, A., Spitkovsky, D., Christoph, B., Kempkes, B., Schuhmacher, M., Staeger, M. S., Brielmeier, M., Ellwart, J., Kohlhuber, F., Bornkamm, G. W., *et al.* (2000). Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line. *Int J Cancer* 87, 787-793.
- Park, J., Wood, M. A., and Cole, M. D. (2002). BAF53 forms distinct nuclear complexes and functions as a critical c-Myc-interacting nuclear cofactor for oncogenic transformation. *Mol Cell Biol* 22, 1307-1316.
- Park, J. M., Werner, J., Kim, J. M., Lis, J. T., and Kim, Y. J. (2001). Mediator, not holoenzyme, is directly recruited to the heat shock promoter by HSF upon heat shock. *Mol Cell* 8, 9-19.
- Park, S. S., Kim, J. S., Tessarollo, L., Owens, J. D., Peng, L., Han, S. S., Tae Chung, S., Torrey, T. A., Cheung, W. C., Polakiewicz, R. D., *et al.* (2005). Insertion of c-Myc into Igh induces B-cell and plasma-cell neoplasms in mice. *Cancer Res* 65, 1306-1315.
- Patel, J. H., Du, Y., Ard, P. G., Phillips, C., Carella, B., Chen, C. J., Rakowski, C., Chatterjee, C., Lieberman, P. M., Lane, W. S., *et al.* (2004a). The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Mol Cell Biol* 24, 10826-10834.
- Patel, J. H., Loboda, A. P., Showe, M. K., Showe, L. C., and McMahon, S. B. (2004b). Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC. *Nat Rev Cancer* 4, 562-568.
- Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M., and Bonner, W. M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 10, 886-895.
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., and Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8392-8396.
- Penn, L. J., Brooks, M. W., Laufer, E. M., and Land, H. (1990). Negative autoregulation of c-myc transcription. *Embo J* 9, 1113-1121.

- Perini, G., Diolaiti, D., Porro, A., and Della Valle, G. (2005). In vivo transcriptional regulation of N-Myc target genes is controlled by E-box methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12117-12122.
- Peukert, K., Staller, P., Schneider, A., Carmichael, G., Hanel, F., and Eilers, M. (1997). An alternative pathway for gene regulation by Myc. *Embo J* 16, 5672-5686.
- Pinhero, R., Liaw, P., Bertens, K., and Yankulov, K. (2004). Three cyclin-dependent kinases preferentially phosphorylate different parts of the C-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II. *Eur J Biochem* 271, 1004-1014.
- Qiu, H., Hu, C., Yoon, S., Natarajan, K., Swanson, M. J., and Hinnebusch, A. G. (2004). An array of coactivators is required for optimal recruitment of TATA binding protein and RNA polymerase II by promoter-bound Gcn4p. *Mol Cell Biol* 24, 4104-4117.
- Rachez, C., Suldan, Z., Ward, J., Chang, C. P., Burakov, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Freedman, L. P. (1998). A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes Dev* 12, 1787-1800.
- Ramanathan, Y., Rajpara, S. M., Reza, S. M., Lees, E., Shuman, S., Mathews, M. B., and Pe'ery, T. (2001). Three RNA polymerase II carboxyl-terminal domain kinases display distinct substrate preferences. *J Biol Chem* 276, 10913-10920.
- Riedl, T., and Egly, J. M. (2000). Phosphorylation in transcription: the CTD and more. *Gene Expr* 9, 3-13.
- Roeder, R. G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 21, 327-335.
- Roeder, R. G. (2005). Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS Lett* 579, 909-915.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., and Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273, 5858-5868.
- Rottbauer, W., Saurin, A. J., Lickert, H., Shen, X., Burns, C. G., Wo, Z. G., Kemler, R., Kingston, R., Wu, C., and Fishman, M. (2002). Reptin and pontin antagonistically regulate heart growth in zebrafish embryos. *Cell* 111, 661-672.
- Roy, A. L., Carruthers, C., Gutjahr, T., and Roeder, R. G. (1993). Direct role for Myc in transcription initiation mediated by interactions with TFIID. *Nature* 365, 359-361.
- Ruhl, D. D., Jin, J., Cai, Y., Swanson, S., Florens, L., Washburn, M. P., Conaway, R. C., Conaway, J. W., and Chrivia, J. C. (2006). Purification of a

human SRCAP complex that remodels chromatin by incorporating the histone variant H2A.Z into nucleosomes. *Biochemistry* 45, 5671-5677.

Sakamuro, D., and Prendergast, G. C. (1999). New Myc-interacting proteins: a second Myc network emerges. *Oncogene* 18, 2942-2954.

Sakurai, H., and Fukasawa, T. (1998). Functional correlation among Gal11, transcription factor (TF) IIE, and TFIIF in *Saccharomyces cerevisiae*. Gal11 and TFIIE cooperatively enhance TFIIF-mediated phosphorylation of RNA polymerase II carboxyl-terminal domain sequences. *J Biol Chem* 273, 9534-9538.

Sato, S., Tomomori-Sato, C., Parmely, T. J., Florens, L., Zybaylov, B., Swanson, S. K., Banks, C. A., Jin, J., Cai, Y., Washburn, M. P., *et al.* (2004). A set of consensus mammalian mediator subunits identified by multidimensional protein identification technology. *Mol Cell* 14, 685-691.

Schlosser, I., Holzel, M., Hoffmann, R., Burtscher, H., Kohlhuber, F., Schuhmacher, M., Chapman, R., Weidle, U. H., and Eick, D. (2005). Dissection of transcriptional programmes in response to serum and c-Myc in a human B-cell line. *Oncogene* 24, 520-524.

Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Holzel, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., Bornkamm, G. W., Laux, G., Polack, A., Weidle, U. H., and Eick, D. (2001). The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res* 29, 397-406.

Schuldiner, O., and Benvenisty, N. (2001). A DNA microarray screen for genes involved in c-MYC and N-MYC oncogenesis in human tumors. *Oncogene* 20, 4984-4994.

Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., and Nevins, J. R. (2000). Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev* 14, 2501-2514.

Seoane, J., Pouponnot, C., Staller, P., Schader, M., Eilers, M., and Massague, J. (2001). TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat Cell Biol* 3, 400-408.

Sheiness, D., Fanshier, L., and Bishop, J. M. (1978). Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. *J Virol* 28, 600-610.

Shim, E. Y., Walker, A. K., Shi, Y., and Blackwell, T. K. (2002). CDK-9/cyclin T (P-TEFb) is required in two postinitiation pathways for transcription in the *C. elegans* embryo. *Genes Dev* 16, 2135-2146.

Sims, R. J., 3rd, Mandal, S. S., and Reinberg, D. (2004). Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription. *Curr Opin Cell Biol* 16, 263-271.

Smale, S. T., and Baltimore, D. (1989). The "initiator" as a transcription control element. *Cell* 57, 103-113.

- Sommer, A., Hilfenhaus, S., Menkel, A., Kremmer, E., Seiser, C., Loidl, P., and Luscher, B. (1997). Cell growth inhibition by the Mad/Max complex through recruitment of histone deacetylase activity. *Curr Biol* 7, 357-365.
- Srivastava, M., Fleming, P. J., Pollard, H. B., and Burns, A. L. (1989). Cloning and sequencing of the human nucleolin cDNA. *FEBS Lett* 250, 99-105.
- Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Moroy, T., Bartek, J., Massague, J., Hanel, F., and Eilers, M. (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol* 3, 392-399.
- Sterner, D. E., and Berger, S. L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 435-459.
- Stevens, J. L., Cantin, G. T., Wang, G., Shevchenko, A., and Berk, A. J. (2002). Transcription control by E1A and MAP kinase pathway via Sur2 mediator subunit. *Science* 296, 755-758.
- Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Stumpf, M., Waskow, C., Krotschel, M., van Essen, D., Rodriguez, P., Zhang, X., Guyot, B., Roeder, R. G., and Borggreffe, T. (2006). The mediator complex functions as a coactivator for GATA-1 in erythropoiesis via subunit Med1/TRAP220. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18504-18509.
- Symonds, G., Hartshorn, A., Kennewell, A., O'Mara, M. A., Bruskin, A., and Bishop, J. M. (1989). Transformation of murine myelomonocytic cells by myc: point mutations in v-myc contribute synergistically to transforming potential. *Oncogene* 4, 285-294.
- Takagi, Y., Calero, G., Komori, H., Brown, J. A., Ehrensberger, A. H., Hudmon, A., Asturias, F., and Kornberg, R. D. (2006). Head module control of mediator interactions. *Mol Cell* 23, 355-364.
- Thomas, M. C., and Chiang, C. M. (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41, 105-178.
- Thompson, C. M., and Young, R. A. (1995). General requirement for RNA polymerase II holoenzymes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4587-4590.
- Toth, J. I., Datta, S., Athanikar, J. N., Freedman, L. P., and Osborne, T. F. (2004). Selective coactivator interactions in gene activation by SREBP-1a and -1c. *Mol Cell Biol* 24, 8288-8300.
- Tsukiyama, T. (2002). The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 422-429.
- Utlei, R. T., Ikeda, K., Grant, P. A., Cote, J., Steger, D. J., Eberharter, A., John, S., and Workman, J. L. (1998). Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature* 394, 498-502.

- van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Battle, E., Coudreuse, D., Haramis, A. P., *et al.* (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111, 241-250.
- van Lohuizen, M., Verbeek, S., Scheijen, B., Wientjens, E., van der Gulden, H., and Berns, A. (1991). Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell* 65, 737-752.
- Vervoorts, J., Luscher-Firzlaff, J. M., Rottmann, S., Lilischkis, R., Walsemann, G., Dohmann, K., Austen, M., and Luscher, B. (2003). Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO Rep* 4, 484-490.
- von der Lehr, N., Johansson, S., Wu, S., Bahram, F., Castell, A., Cetinkaya, C., Hydbring, P., Weidung, I., Nakayama, K., Nakayama, K. I., *et al.* (2003). The F-box protein Skp2 participates in c-Myc proteosomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription. *Mol Cell* 11, 1189-1200.
- Wada, O., Oishi, H., Takada, I., Yanagisawa, J., Yano, T., and Kato, S. (2004). BRCA1 function mediates a TRAP/DRIP complex through direct interaction with TRAP220. *Oncogene* 23, 6000-6005.
- Wang, G., Balamotis, M. A., Stevens, J. L., Yamaguchi, Y., Handa, H., and Berk, A. J. (2005). Mediator requirement for both recruitment and postrecruitment steps in transcription initiation. *Mol Cell* 17, 683-694.
- Wang, G., Cantin, G. T., Stevens, J. L., and Berk, A. J. (2001). Characterization of mediator complexes from HeLa cell nuclear extract. *Mol Cell Biol* 21, 4604-4613.
- Warren, A. J. (2002). Eukaryotic transcription factors. *Curr Opin Struct Biol* 12, 107-114.
- Washington, K., Ammosova, T., Beullens, M., Jerebtsova, M., Kumar, A., Bollen, M., and Nekhai, S. (2002). Protein phosphatase-1 dephosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase-II. *J Biol Chem* 277, 40442-40448.
- Watanabe, Y., Fujimoto, H., Watanabe, T., Maekawa, T., Masutani, C., Hanaoka, F., and Ohkuma, Y. (2000). Modulation of TFIIH-associated kinase activity by complex formation and its relationship with CTD phosphorylation of RNA polymerase II. *Genes Cells* 5, 407-423.
- Watson, J. D., Oster, S. K., Shago, M., Khosravi, F., and Penn, L. Z. (2002). Identifying genes regulated in a Myc-dependent manner. *J Biol Chem* 277, 36921-36930.
- Winston, F., and Allis, C. D. (1999). The bromodomain: a chromatin-targeting module? *Nat Struct Biol* 6, 601-604.

- Wood, M. A., McMahon, S. B., and Cole, M. D. (2000). An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Mol Cell* 5, 321-330.
- Wu, J., and Grunstein, M. (2000). 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem Sci* 25, 619-623.
- Wu, S., Cetinkaya, C., Munoz-Alonso, M. J., von der Lehr, N., Bahram, F., Beuger, V., Eilers, M., Leon, J., and Larsson, L. G. (2003). Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. *Oncogene* 22, 351-360.
- Yano, T., Sander, C. A., Clark, H. M., Dolezal, M. V., Jaffe, E. S., and Raffeld, M. (1993). Clustered mutations in the second exon of the MYC gene in sporadic Burkitt's lymphoma. *Oncogene* 8, 2741-2748.
- Yeh, E., Cunningham, M., Arnold, H., Chasse, D., Monteith, T., Ivaldi, G., Hahn, W. C., Stukenberg, P. T., Shenolikar, S., Uchida, T., *et al.* (2004). A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat Cell Biol* 6, 308-318.
- Yudkovsky, N., Ranish, J. A., and Hahn, S. (2000). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* 408, 225-229.
- Zeller, K. I., Jegga, A. G., Aronow, B. J., O'Donnell, K. A., and Dang, C. V. (2003). An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets. *Genome Biol* 4, R69.
- Zeller, K. I., Zhao, X., Lee, C. W., Chiu, K. P., Yao, F., Yustein, J. T., Ooi, H. S., Orlov, Y. L., Shahab, A., Yong, H. C., *et al.* (2006). Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17834-17839.
- Zhang, J., and Fondell, J. D. (1999). Identification of mouse TRAP100: a transcriptional coregulatory factor for thyroid hormone and vitamin D receptors. *Mol Endocrinol* 13, 1130-1140.
- Zhang, X. Y., DeSalle, L. M., and McMahon, S. B. (2006). Identification of novel targets of MYC whose transcription requires the essential MblI domain. *Cell Cycle* 5, 238-241.
- Zhao, J. H., Inoue, T., Shoji, W., Nemoto, Y., and Obinata, M. (1998). Direct association of YY-1 with c-Myc and the E-box binding protein in regulation of glycophorin gene expression. *Oncogene* 17, 1009-1017.
- Zhou, R., Bonneaud, N., Yuan, C. X., de Santa Barbara, P., Boizet, B., Schomber, T., Scherer, G., Roeder, R. G., Poulat, F., and Berta, P. (2002). SOX9 interacts with a component of the human thyroid hormone receptor-associated protein complex. *Nucleic Acids Res* 30, 3245-3252.
- Zippo, A., De Robertis, A., Serafini, R., and Oliviero, S. (2007). PIM1-dependent phosphorylation of histone H3 at serine 10 is required for MYC-dependent

transcriptional activation and oncogenic transformation. Nat Cell Biol 9, 932-944.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

Sofern nicht hier aufgeführt, wurden Abkürzungen entsprechend den Maßangaben der IUPAC (*International union of pure and applied chemistry*) und denen des SI-Systems (*System Internationale de l'Unité*) verwendet. Spezielle Abkürzungen für Fachtermini, die nicht in dieser Liste enthalten sind, werden jeweils im Text erläutert.

A	Adenosin
A	Ampère
Abb.	Abbildung
ad	aufzufüllen auf
AK	Antikörper
AdML	Adenovirus Major Late
α -	anti-
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	alternative reading frame
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BR/HLH/LZ	Basische Region/ Helix-Loop-Helix/ Leuzinzipper-Motiv
bp	Basenpaare
β -Gal.	β -Galaktosidase
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise

C	Cytosin
C-Terminus	Carboxy-Terminus
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Cdk	cyclin dependent kinase (Cyclin abhängige Kinase)
cDNA	copy DNA
CMV	Cytomegalovirus
CTD	C-Terminale Domäne
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DH5α	E. coli Klonierungsstamm
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
EB	elution buffer
E-Box	Enhancer-Box
ECL™	enhanced chemoluminescence
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

eGFP	enhanced green fluorescent protein
et al.	und andere
FACS	Fluorescence activated cell sorting, Durchflussszytometrie)
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FLAG	Peptid-Epitop (DYKDDDDK)
g	Gramm
G	Guanosin
G1-Phase	Gap1-Phase
G2-Phase	Gap2-Phase
GFP	green fluorescent protein
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HAT	Histon-Acetyltransferase
HBS	Hepes-gepufferte Salzlösung
HDAC	Histon-Dezetyltransferase
HECT	homologous to E6AP C-terminus
HEPES	N2-Hydroxyethylpiperazin-N2-Ethansulfonsäure
HLH	Helix-Loop-Helix-Domäne
HRP	horseradish peroxidase
INR	Initiator-Element
Ip	Immunpräzipitation
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Kip	kinase inhibitory protein

Kon-AK	Kontroll-Antikörper
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
Leu	Leuzin
LZ	Leuzin-Zipper
m	milli
M	molar
Max	Myc-associated X factor
min	Minute(n)
Miz-1	Myc interacting zinc finger protein 1
M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase
Myc	Myelocytomatose Protein
mRNA	messenger RNA
μ	mikro
n	nano
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus
NLS	nuclear localization signal (Kernlokalisationssignal)
NP-40	Nonidet P-40
NR-Box	nucleärer Rezeptor-Box
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
P	Prolin
PA	Polyacrylamid

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PI	Propidiumjodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POZ	Poxvirus und Zinkfinger-Domäne
puro	Puromycin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Py	Pyrimidinbase
q	Quantitativ
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RNAPII	RNA-Polymerase II-Komplex
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
S	Serin
S	small (kleine ribosomale Untereinheit)
S	Svedberg (z.B. in 80S Ribosom)
SDS	sodium dodecyl sulfate
sec	Sekunde
shRNA	short hairpin RNA
SIR2	silent information regulator 2

T	Threonin
T	Thymidin
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TE	Tris/EDTA (Puffer)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGFβ	Transforming growth factor β
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht
Vol.	Volumen
VT	Volumenteil
v/v	volume to volume (Volumen zu Volumen)
WB	Westernblot
wt	Wildtyp
w/v	weight per volume (Gewicht zu Volumen)
Y	Thyrosin
z.B.	zum Beispiel
ZF	Zinkfinger
-/-	homozygote Gendeletion

8.2 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

in Bayreuth: Arens; Beck; Arens; Beck; Beer; Bertling; Dettner; Friedrich; Hoffmann; Hoffmann; Jensen; Kalus; Komor; Krämer; Matzner; Meyer; Rehberg; Reissinger; Romanowski; Santiago; Schlarmann; Schmid; Schnick; Scholze; Schulze; Seifert; Spitteller; v.Holst; Wiegner; Ziegler

In Kassel: Euler; Ewert; Haberlein; Kutschera; Leuschner; Mayer; Maniak; Nellen; Schmidt

In Martinsried: Grimm

in Marburg: Eilers

8.3 Danksagung

Ich möchte mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Eilers, der mir ein sehr interessantes Thema bereit gestellt hat, die Mitarbeit in mehreren wissenschaftlichen Kooperationen ermöglichte und mir mit stets freundlicher Diskussionsbereitschaft und vielen guten Anregungen zur Seite stand.

Innerhalb der wissenschaftlichen Kooperationen danke ich besonders Dr. Joan Conaway und Dr. Chieri Tomomori-Sato für zahlreiche Tipps im Umgang mit dem Mediatorkomplex und die Bereitstellung der Mediator-Reagenzien.

Danke an Till Kortüm und Dorothea Maaß für die Weiterführung des Projektes.

Für technische Unterstützung bei den Reporterassays und Plasmidpräparationen danke an Michael Neuhaus sowie Inge Pelz. Für Hilfestellungen bei den ChIP-Experimenten ein herzliches Dankeschön an Dr. Caroline Bouchard und Dr. Werner Lutz.

Vielen Dank an Dr. Vincent Beuger für die nette *Bench*-Nachbarschaft und viele konstruktive Diskussionen. Für ein gutes Arbeitsklima, viele Tipps und Hilfestellungen danke ich Dr. Steffi Herold, Dr. Michael Wanzel, Dr. Vincent Beuger, Viola Paulus, Tobias Otto, Dr. Sovana Adhikary, Mona Meyer, Judith Marquardt, Andreas Hock, Till Kortüm, Stefan Trumm, Inge Pelz, Bianca Jebavy, Dr. Ursula Eilers, Hannelore Ballach sowie allen nicht namentlich genannten ehemaligen Mitarbeitern.

Für Hilfe bei Computerproblemen und kritisches Korrekturlesen danke ich Jörg Hucklenbroich.

8.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Mechanismen der transkriptionellen Regulation durch c-Myc“

am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. Martin Eilers ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde im Wesentlichen wie folgt veröffentlicht:

- Sovana Adhikary; Federica Marinoni, Andreas Hock, Esther Hulleman, Nikita Popov, Rudi Beier, Sandra Bernard, Micaela Quarto, Maria Capra, Stephan Goettig, Ulrike Kogel, Martin Scheffner, Kristian Helin, Martin Eilers (2005): The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. *Cell* 123, 409-421.
- Sandra Bernard, Chieri Tomomori-Sato, Joan Conaway, Martin Eilers (2005): Med24/Trap100 interacts with c-Myc and is required for Myc transactivation. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; 31. August – 4. September 2005
- Martin Schlee, Michael Hölzel, Sandra Bernard, Reinhard Mailhammer, Marino Schuhmacher, Dirk Eick, Dragan Marinkovic, Thomas Wirth, Andreas Rosenwald, Louis M. Staudt, Martin Eilers, Fanny Baran-Marszak, Remi Fagard, Jean Feuillard, Gerhard Laux, and Georg W. Bornkamm (2007): c-MYC activation impairs the interferon response in Burkitt lymphoma cells. *Int J Cancer*. 2007 Apr 1;120 (7):1387-95.
- Sandra Bernard and Martin Eilers (2006): Control of Cell Proliferation and Growth by Myc proteins. *Results Probl Cell Differ*. 2006; 42:329-42

Weitere Veröffentlichungen:

- Bernd Berwanger, Oliver Hartmann, Eckhard Bergmann, Sandra Bernard, Dirk Nielsen, Michael Krause, Ali Kartal, Daniel Flynn, Ruprecht Wiedemeyer, Manfred Schwab, Helmut Schäfer, Holger Christiansen and Martin Eilers (2002): Loss of a Fyn-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma. *Cancer Cell* 2002, Nov 2 (5): 377-86
- Judith Roth, Claudia Lenz-Bauer, Ana Contente, Kristina Löhr, Philipp Koch, Sandra Bernard and Matthias Dobbelsstein (2003): Reactivation of mutant p53 by a one-hybrid adaptor protein. *Cancer Res*. 2003 Jul 15; 63 (14): 3904-8